

生命科学实验指南系列

Transgenic Wheat, Barley and Oats
Production and Charaterization Protocols

麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南

〔英〕H.D.琼斯　P.R.休里 主编

王建军 等 译

孙宗修 校



科学出版社

(Q-3225.01)



生命科学实验指南系列

- 现代生物化学与分子生物学仪器与设备
- 干细胞实验指南
- 现代分子生物学实验原理与技术
- R语言及Bioconductor在基因组分析中的应用
- 现代神经科学研究技术
- 精编分子生物学实验指南（第五版）
- 精编细胞生物学实验指南
- 精编蛋白质科学实验指南
- 分子细胞遗传学——技术与应用
- DNA微阵列实验指南
- 生理学实验指南
- 动物细胞培养——基本技术指南（第五版）
- 植物生物学与生态学实验
- 实验细胞资源的描述标准与管理规范
- 实验动物设施运行管理指南
- 生命科学实验设计指南
- 基因转移——DNA和RNA的转运与表达
- 精编免疫学实验指南
- 精编人类遗传学实验指南
- 现代细胞生物学技术
- 现代工业微生物学实验技术
- 人干细胞培养
- 单分子技术实验指南
- 遗传变异分析实验指南
- 免疫学技术及其应用
- 表皮细胞实验指南
- 现代蛋白质工程实验指南
- 神经生物学实验原理与技术
- 实验动物血液生理生化参考手册
- 病毒的电子显微学研究
- 元基因组学：方法和步骤（影印版）
- 生物衰老：研究方法与实验方案
- 真核生物转录调控：概念、策略与技术（第二版）
- 麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：生物学／分子生物学

www.sciencep.com

ISBN 978-7-03-039056-1



定 价：128.00 元

Transgenic Wheat, Barley and Oats
Production and Characterization Protocols

麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南



生命科学实验指南系列

麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南

Transgenic Wheat, Barley and Oats

Production and Characterization Protocols

〔英〕H. D. 琼斯　P. R. 休里　主编

王建军 等　译

孙宗修　校

科学出版社

北京

图字：01-2013-6031 号

内 容 简 介

转基因技术目前已成为植物遗传改良的重要手段，并在棉花、大豆、油菜、玉米等作物上成功应用，转基因作物已在部分国家大面积推广应用。本书共分为五篇 20 章，第一篇概述了麦类作物转基因研究的现状。第二篇以小麦、大麦和燕麦为例，介绍了基因枪法和农杆菌介导法的遗传转化与再生技术。第三篇涉及基因的表达与基因沉默技术。第四篇详述了转基因植株的鉴定技术，如荧光原位杂交技术、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和环境风险评估等。第五篇展望了麦类作物转基因研究的未来前景。

本书深入浅出、图文并茂，对生物学、农学、环境科学和食品科学等领域的高等院校或科研单位的学生和研究人员是很好的参考书和实验操作指南，也有助于植物生物技术产业或环境部门公务员制定相关政策。

Translation from the English language edition：

Transgenic Wheat，*Barley and Oats* edited by Huw D. Jones；Peter R. Shewry

图书在版编目（CIP）数据

麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南/(英）琼斯（Jones，H. D.）等主编；王建军等译. —北京：科学出版社，2013. 11

（生命科学实验指南系列）

书名原文：Transgenic Wheat，Barley and Oats Production and Characterization Protocols

ISBN 978-7-03-039056-1

Ⅰ. ①麦…　Ⅱ. ①琼…②王…　Ⅲ. ①麦类作物-转基因技术-鉴定-指南　Ⅳ. ①S512. 03-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 260745 号

责任编辑：夏　梁　刘　晶／责任校对：郭瑞芝

责任印制：赵德静／封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行　各地新华书店经销

*

2013 年 11 月第　一　版　　开本：787×1092　1/16

2013 年 11 月第一次印刷　　印张：18 3/4　插页：4

字数：424 000

定价：128. 00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

序

1983年，世界上第一例转基因植物——一种含有抗生素药类抗体的烟草在美国成功培植。当时有人惊叹："人类开始有了一双创造新生物的'上帝之手'！"几十年后，转基因技术得到了迅猛发展，继水稻之后，主要农作物如小麦、玉米、大豆等全基因组测序都已完成或正在进行中，这为小麦等主要农作物的转基因研究提供了极大的方便。转基因研究正在农业领域越来越广泛地开发与应用，转基因技术也将成为全世界农业科技发展的必经之路。

转基因技术是将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体性状的遗传修饰。在原理上，转基因技术是传统育种方法的延伸，因此在健康、环保等问题方面，并不比传统作物有更高的风险。世界卫生组织等权威机构都曾表示转基因食品是安全的，可以放心食用。应该坚信中国的未来离不开转基因技术，但对于转基因的研究和应用，仍然必须强调积极、慎重，要科学地借鉴与学习国外成熟的研究技术和先进的管理经验。

英国洛桑研究所（Rothamsted Research）是一所世界著名的农业科研中心，其前身为由John Bennet Lawes于1843年建立的洛桑实验站，至今已有170年的历史，是世界上最古老的农业研究站之一。该研究所拥有多名英国皇家学会成员，是全英国最大的农业研究中心之一。该研究所拥有全英国小麦育种与小麦转基因研究的领军团队，其抗病虫害转基因小麦获得了政府部门的田间试验许可。由洛桑研究所资深科学家Huw D. Jones和Peter R. Shewry两位学者主编的《麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南》是作物转基因技术研究的优秀专著。全书由44位在相应的研究领域有一定学术成就的专家、学者组成的20个小组编写完成，对转基因研究的主要环节与技术都有详尽的叙述。该专著结构严谨、层次清晰、文笔流畅、通俗易读，适于从事转基因研究的各方面人员阅读与参考。

浙江省农业科学院省部共建国家重点实验室培育基地"浙江省植物有害生物防控重点实验室"的王建军等25位科技人员，历经一年多的辛勤劳动，完成了该书的翻译工作。他们始终贯以严谨、求实、敬业的精神，几经修改与校对，今天，中译本终于可以奉献给读者了，在此，对他们取得的成绩表示祝贺。

21世纪是科学知识飞速发展的时代，转基因研究也不例外，一些研究前沿和新技术开发更是日新月异。2009年出版的该书，在某些热点技术上，可能会有更新或改进。他山之石，可以攻玉，期望这本译著能为读者提供某些启发与借鉴，为我国转基因研究提供规范的操作指导。

陈剑平

中国工程院院士

发展中国家科学院院士

浙江省农业科学院院长

2013年6月

译者序

本书由英国洛桑研究所的 Huw D. Jones 和 Peter R. Shewry 两位学者，组织国际上一批研究精英所著。经过 20 多位编译人员历时一年多的努力，中译本终于可以与读者见面了。

为什么我们要组织人员对本书进行翻译呢？这还得从我国转基因研究说起。农业部农业转基因生物安全委员会于 1997 年开始批准番茄、甜椒、黄瓜、棉花及矮牵牛等植物的中间试验、环境释放和转基因商品化生产。据 Clive James 报道，2012 年中国种植转基因作物面积超过 500 万公顷（应全部是棉花——译者注），列全球第四位（http://www. isaaa. org /purchasepublications/itemdescription. asp? ItemType = BRIEFS&Control = IB044-2012）。作物的转基因研究涉及转基因实验室试验、生物试验、生产评价试验以及转基因产品无害化处理等内容，技术环节严谨，监管要求严格。与国内相比，在转基因研究技术与管理经验方面，欧美国家有着独特的领先优势，而国内可参考的技术与管理书籍不多。2009 年，在撰写转基因项目申请书时，我们急需一本可参考的权威性著作，而本书既详尽地介绍了植物转基因实验的原理与操作技术，又涉及了转基因植株的功能鉴定、田间试验管理、安全性评价等领域，是一本全面而详尽、实用而严谨，有很强技术操作指导意义的植物转基因研究的最新参考书。在孙宗修老师的提议下，我们设想组织翻译中文版。经与原著作者联系及向 Humana 出版社申请，2011 年获得了翻译中文版的许可。

本书共分为 5 篇、20 章，内容从转基因植株和报告基因的选择、基因枪转化、农杆菌介导转化、转基因表达鉴定、插入位点和整合片段的检测、转录组学和蛋白质组学鉴定，到田间试验的设计与管理及转基因风险评估，涵盖了转基因研究的各个环节与各个层面的内容，既有原理的阐述，又有实际操作的例子，是一本作物转基因研究的实验指导书。本书适合于高年级本科生和研究生使用，对于从事植物分子遗传学或分子育种学研究人员也是十分有用的参考书。

参加本书翻译的人员中，多数是有相关研究工作经历的研究骨干或有国外留学经历的研究人员。各章节译者分别是：张恒木、王建军（第 1 章）；祁永斌（第 2 章）；赵建华、瞿绍洪（第 3 章）；徐恒、朱英（第 4 章）；张礼霞、范宏环（第 5 章）；李付振（第 6 章）；徐磊、易可可（第 7 章）；周洁、严成其（第 8 章）；周洁、严成其（第 9 章）；徐磊、易可可（第 10 章）；张礼霞（第 11 章）；陈蕾（第 12 章）；张华、朱英（第 13 章）；董波、周波（第 14 章）；鲍坚东、周波（第 15 章）；楚璞、邓志平（第 16 章）；楚璞、邓志平（第 17 章）；王建军（第 18 章）；徐俊锋（第 19 章）；王美兴、王建军（第 20 章）。

在翻译的过程中，有幸邀请到原书第 5 章的第一作者吴晖霞作为中译本部分章节的校阅人，她的工作认真仔细，解决了许多技术层面的难题。孙宗修老师参与了翻译的全

程工作，对全书的翻译与校阅付出了大量的心血。郑怡女士对部分章节的译文进行了润色，对翻译的技巧提出了十分有益的建议，对于这些帮助我们万分感谢。对于原书的一些技术和书写上的欠妥之处，我们在尽可能忠于原著的基础上予以了改正。虽然我们尽心尽力并多次修改与校阅，但译本中错误与疏漏难免存在，对此我们恳请读者朋友谅解并不吝指正。

本书的翻译得到了浙江省农业科学院"浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地"和浙江省高校"重中之重学科"—"现代农业生物技术与作物病害防控"的大力支持。感谢所有参与翻译和校阅，以及为我们的工作提供方便和帮助的老师与同学；感谢科学出版社的夏梁先生，作为本书的责任编辑，在合作过程中得到了他的大力帮助与支持。

另外值得一提的是，在全书的翻译、校阅和通读过程中，我们也从中学习并领悟了许多知识与写作技巧，希望读者朋友在阅读本书时，获得同样的享受！

王建军

2013 年春于杭州

前　言

了解禾谷类作物基因组的物理结构和遗传结构，探索基因的编码区和非编码区是如何与环境互作而决定某一性状，上述知识对未来的植物育种与农业生产具有重要的作用。转基因植物的获得与鉴定是一种非常有用的反向遗传学研究方法。在禾谷类作物中，越来越多地运用这一技术，将性状或功能精确地定位到 DNA 序列中。然而，迄今为止，对小麦、大麦和燕麦等麦类作物而言，科学家一直缺乏开展这项研究所需的技术和资料，有的甚至是完全空白。本书汇集了适宜于麦类作物的基因枪法和农杆菌介导法、转基因植株再生和筛选等步骤的最新实验操作技术，包括体外农杆菌共培养，以及一种新的不需组培再生的活体转化（germ line transformation）技术。此外，还有几章着重讲述了基因表达的实验操作、重组位点和转基因植株的鉴定。最后，本书还涉及了转基因风险评估、田间试验设计，以及转录组学、蛋白质组学、代谢组学的实质等同性等知识。虽然本书主要是针对小麦、大麦和燕麦等温带小粒作物，但是所介绍的许多技术稍加改进后也可以用于其他禾谷类作物或植物的研究。

感谢所有章节的作者为本书提供新颖而翔实的资料，感谢 Humana 出版社的全体成员，尤其是 John Walker 的指导工作，Helen Jenkins 的校对、文字处理和组织工作。

作者名单

SUJATA AGARWAL · 田纳西大学 植物科学系, *Knoxville*, *TN*, *USA*

SILVIA C. ALVES · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *JohColney*, *Norwich*, *UK*

JOHN M. BAKER · 洛桑研究所 植物与微生物代谢组学国家中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

TINA BARSBY · 英国国家农业植物研究所, *Cambridge*, *UK*

JOANNE G. BARTLETT · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

MARÍA MARCELA BAUDO · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

MICHAEL H. BEALE · 洛桑研究所 植物与微生物代谢组学国家中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

ZOLTÁN BEDÖ · 匈牙利科学院 农业研究所, *Hungary*

SARAH BOWDEN · 英国国家农业植物研究所, *Cambridge*, *UK*

MELANIE CRAZE · 英国国家农业植物研究所, *Cambridge*, *UK*

ANGELA DOHERTY · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

JIM M. DUNWELL · 雷丁大学 生物科学学院, *Reading*, *Berkshire*, *UK*

WENDY A. HARWOOD · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

ALISON HUTTLY · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

HUW D. JONES · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

BEAT KELLER · 苏黎世大学 植物生物学研究所, *Zürich*, *Switzerland*

LÁSZLÓ LÁNG · 匈牙利科学院 农业研究所, *Hungary*

PAUL A. LAZZERI · Agrasys S. L. 公司, *Barcelona*, *Spain*

NICOLA LEYLAND · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

STAR LOAR · 田纳西大学 植物科学系, *Knoxville*, *TN*, *USA*

ALISON LOVEGROVE · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

SHAHINA B. MAQBOOL · 雪城大学 生物学系, *Syracuse*, *NY*, *USA*

ROWAN A. C. MITCHELL · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

HESHAM F. ORABY · 密歇根州立大学 园艺学系, *East Lansing*, *MI*, *USA*

WYATT PAUL · Biogemma 公司, *Clermont-Ferrand Cedex 2*, *France*

MATTHEW PERRY · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

STEPHEN J. POWERS · 洛桑研究所 生物数学与生物信息学系 生物数学与计算生物学中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

MARIANN RAKSZEGI · 匈牙利科学院 农业研究所, *Hungary*

THIERRY RISACHER · Biogemma 公司 *Clermont-Ferrand Cedex 2*, *France*

LOUISE SALT · 食品研究所 构建健康食品研究小组, *Colney*, *Norwich*, *UK*

TRUDE SCHWARZACHER · 莱斯特大学 生物学系, *Leicester*, *UK*

PETER R. SHEWRY · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

MARK A. SMEDLEY · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

JOHN W. SNAPE · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

CAROLINE A. SPARKS · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

PENELOPE A. C. SPARROW · 约翰英纳斯研究中心, *Colney*, *Norwich*, *UK*

CAMILLE STEBER · USDA/ARS 小麦遗传、品质、生理与植病研究组, *Pullman*, *WA*, *USA*

MARIAM B. STICKLEN · 密歇根州立大学 作物与土壤科学系, *East Lansing*, *MI*, *USA*

VERA THOLE · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

SILVIA TRAVELLA · 苏黎世大学 植物生物学研究所, *Zürich*, *Switzerland*

PHILIPPE VAIN · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney*, *Norwich*, *UK*

JANE L. WARD · 洛桑研究所 植物与微生物代谢组学国家中心, *Harpenden*, *Hertfordshire*, *UK*

HUIXIA WU · CIMMYT 遗传资源与改进研究组, *Mexico DF*, *Mexico*

JANICE ZALE · 田纳西大学 植物科学系, *Knoxville*, *TN*, *USA*

HENG ZHONG · SABRI, 三角研究园, NC, USA

目　　录

第三篇　基因与蛋白质的表达

第四篇　转基因植株的鉴定

第五篇　总　　结

第一篇　引　　言

第1章 麦类作物转基因操作与鉴定

Paul A. Lazzeri　Huw D. Jones

摘　要：自20世纪80年代初期首次利用模式植物研究植物基因转化技术以来，许多植物科学家致力于改进这项技术，以使其能适用于作物遗传转化研究。对某些农作物，这项技术得到较快的发展；但对另一些作物，如小粒作物，由于其自身并不适合体外组织培养，也不是农杆菌的天然寄主等原因，科学家们花费了近二十年的时间，才研发出可靠、稳定的遗传转化技术。

在本书后续的章节，将为读者展示小粒作物遗传转化的操作步骤，以及转基因植物鉴定、基因和蛋白质表达的研究方法。本章为全书的引言部分，为后续章节的叙述作铺垫，并全面回顾了小粒作物遗传转化技术的发展历程，探讨了转基因技术的利与弊，同时指出了当前该技术发展仍面临的技术瓶颈。

关键词：小粒作物，遗传转化，基因枪，农杆菌，组织培养，再生，筛选，启动子，报告基因

1. 基因枪转化技术的发展及其在小粒作物中的应用

20世纪80年代后期，基因枪转化技术首次被应用于植物研究，该方法先将DNA包被在微粒的表面，随后将这些微粒射入活体组织细胞内［1］。1989年，首次报道采用基因枪法获得了可育的转基因玉米［2］（图1.1）。正如20世纪80年代初期，农杆菌被证实可使易感染作物获得遗传稳定的转基因植物，基因枪转化技术的成功无疑是谷类作物转基因研究的重大突破［3］。

一般认为，禾谷类作物极难被农杆菌浸染，T-DNA插入也不易发生［4］。经过十多年的努力，采用农杆菌转化禾谷类作物并没有获得转化植株。在这种情况下，基因枪转化技术的出现对当时的禾谷类作物转基因研究具有非常重要的意义。之后的研究表明，农作物对农杆菌并不存在不亲和性，并针对所有主要谷类作物建立了农杆菌介导法遗传转化方案（图1.1）（将在本章第3节、第5~7章及第9章中讨论）。但是，20世纪90年代初期，转基因技术应用于谷类作物的主要瓶颈是缺乏有效的遗传转化技术［5］。由于在农杆菌转化禾谷类作物方面的研究未取得成功，促进了其他一系列直接基因转化法（DGT）的研发，包括DNA浸润法、DNA宏量和微量注射法、电激法、电泳法、超声和激光介导的DNA吸入法、使用碳化硅微纤维和原生质体的转化法。使用这些方法都证实了外源DNA可以导入受体细胞，尤其是电激法、碳化硅微纤维和原生质体的转化法已在水稻与玉米中获得大量的转基因植株，但这些技术依赖于特定的细胞培

养体系，且对技术的要求较高［6］。

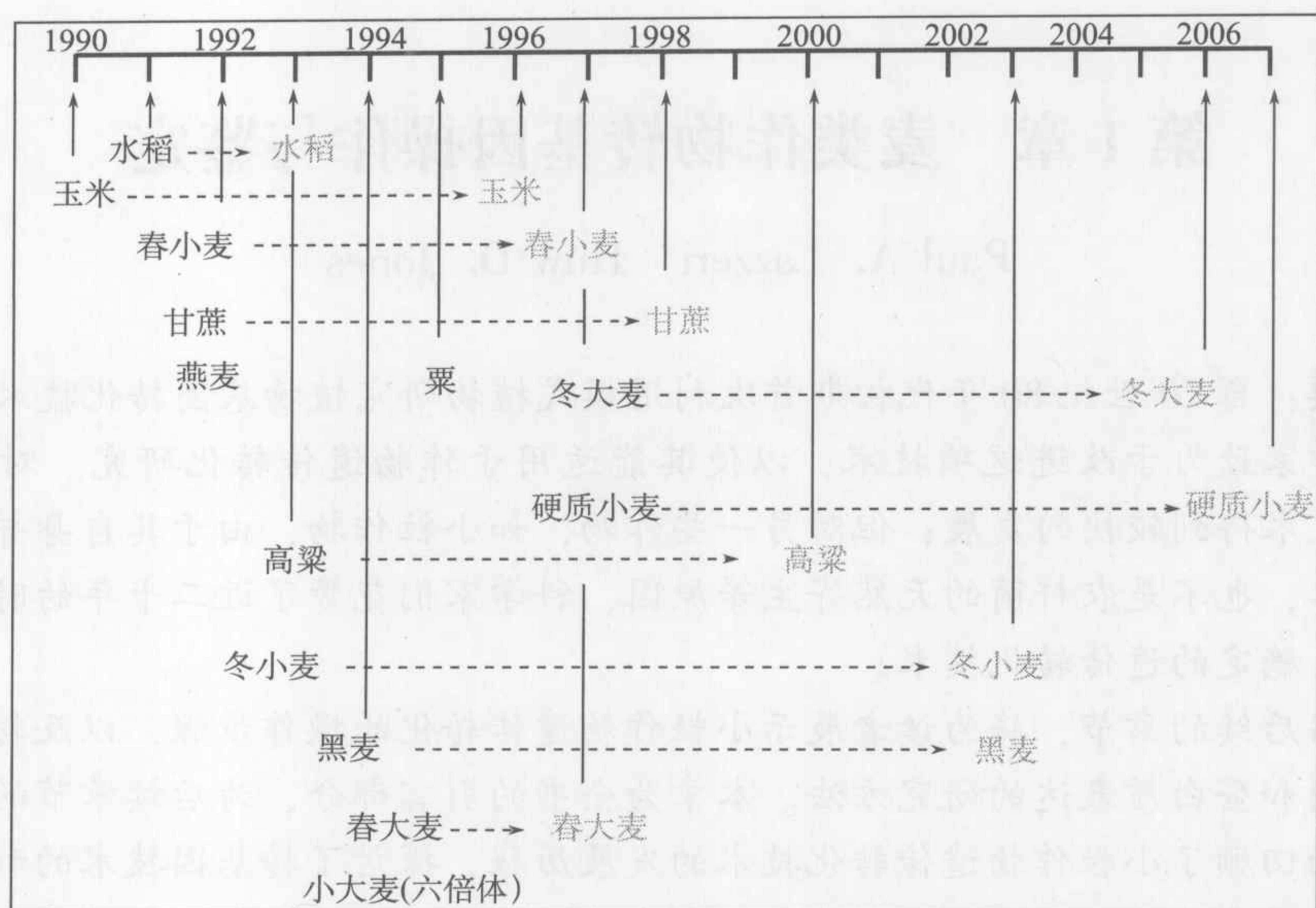


图 1.1　主要谷类作物遗传转化首次报道的时间线。
基因枪法（黑色）和农杆菌介导法（灰）

相比之下，人们马上意识到基因枪转化法有潜力为许多不同类型的细胞传送 DNA，包括直接取自植株的外植体和离体培养的细胞。这就有可能把基因转入可再生成植株的细胞中，包括转入胚性愈伤组织或盾片等胚性组织中。这对大麦、小麦和燕麦等小粒作物尤为重要，因为建立这类作物的可再生细胞悬浮培养体系是非常困难的，而该类细胞又是其他直接基因转化法（DGT）首选的受体材料。

基因枪转化法被迅速地认可还归因于其另一特性，即它非常适合于基因瞬时表达的比较研究。通过轰击平行培养材料，随后可通过生化实验或通过统计如 β-葡萄糖醛酸酶（GUS）等可视化标记基因的表达斑点的定量分析评估标记基因的表达，从而很容易地比较不同载体基因的表达水平。在早期研发稳定的禾谷类遗传转化实验方案过程中，瞬时表达分析是一项重要的工具，因为它能用于优化 DNA 转入受体组织的各项参数并用于鉴定使基因高水平表达的启动子序列。

在基因枪转化法刚开始使用的时期，测试了许多不同的粒子加速系统，包括一些用于测试炸药、氮气、氦气或空气的高压脉冲，或静电放电装置［7］。多数装置是无法在市场上购置而由私人作坊制作的，因此，不同研究组之间所获得的实验结果很难比较和重复。然而，Bio-Rad 公司的 DPS-1000/He 基因枪一经商业化，就被认为是最通用且高效的仪器，很快成为公认的标准装置［8］。

在基因枪轰击玉米胚性悬浮细胞获得成功之后［2］，小粒禾谷类作物基因枪法转化的早期实验一般以愈伤组织为受体组织。在这些试验中，通过基因瞬时表达评估，分

析了影响基因导入的参数［9，10］，并获得了一些稳定的转基因愈伤组织和转基因植株［11，12］，但普遍认为愈伤组织并不是理想的受体材料，其再生潜力不高且随着连续继代培养而下降。因此，几个实验室试验转而使用幼胚或盾片替代愈伤组织作为受体材料。在 20 世纪 90 年代初，尽管首批燕麦转基因植株是由基因枪轰击愈伤组织获得的［19］（图 1.1），但同时几个研究组以小麦［13~15］和大麦［16~18］初级胚性组织为受体材料也获得了可育的转基因植株。在基因枪法转化小麦和大麦的研究中，幼胚和盾片至今仍是首选的受体材料，这很大程度上是因为二者在各种组培系统中具有最高的再生能力。但它们也存在缺陷，供体材料必须持续提供从开花至种子发育初期所需的外植体材料，这一缺点促进了寻找其他受体材料的研究。利用基因枪轰击，尝试了大量其他外植体和组培材料，包括来自小孢子［19，20］、幼穗［21，22］、成熟种子［23，24］、叶基［25］和分生组织［26］的组培材料，并已成功获得了转基因植株。其中一些受体材料，如种子或分生组织的组培材料，尽管使用起来比幼胚和盾片更为方便，但其转化效率较低，因此至今尚未被广泛使用。

自从最初使用基因枪法获得转基因小麦、大麦和燕麦植株以来，在以下两个主要领域的研究提高了基因枪法转化系统的效率，从而获得了可靠的、高通量的、实用的遗传转化方案，该方案适用于更广范围的基因型，包括一些优良的品系。第一个领域是对各种实验参数，如组培和再生的步骤［27，28］、轰击的条件［29，30］和筛选方案［31，32］的分析及优化取得了重大进展。第二个领域是研发了适用于优良品种的转化方案，该方案使得作物种质的遗传转化无需通过预筛选［33，34］。但对于作物遗传转化效率而言，基因型限制仍然是一个主要因素。这一方面的内容将在第 6 节中进行讨论。

基因枪法是小粒作物首次获得转基因植株的方法。十多年来，该方法已广泛用于基础研究和应用研究。如今，该方法已成为实验室开展禾谷类生物技术研究的一个标准技能。与农杆菌介导的遗传转化法相比，在以商业化品种为目标的转基因植株的生产能力上，基因枪法有一定的劣势，因为它易产生更复杂的转基因整合模式（将在第 4 节中讨论），这可能导致基因表达及遗传的不稳定，但它仍然是一种重要的研究工具。

2. 小粒作物中农杆菌遗传转化法的发展与应用

部分农杆菌属细菌能转移基因并引发冠瘿瘤，这一现象启发了植物遗传工程的思路，设想可否利用农杆菌属细菌导入一定长度外源基因。明确冠瘿瘤病原菌是土壤细菌虽已有百年历史［35］，但其不同生物界之间基因转移的分子机理则晚了 70 年才得以阐明［36］。冠瘿瘤是由于部分 Ti 质粒（T-DNA）转入宿主组织细胞引发的，这段 T-DNA 上含有编码生长素、细胞分裂素，以及指导氨基酸或糖衍生物合成的蛋白酶基因，这些基因的表达导致植物细胞增生而形成瘤［37~40］。除了 T-DNA 本身外，另外两个遗传区域也是成功形成根瘤所必需的：一个区域是位于农杆菌染色体上的 *chv* 基因和 *att* 基因，其功能是识别并结合易感染的植物细胞；另一个是 Ti 质粒携带的毒性基因——*vir* 基因，它是 T-DNA 加工和转化所必需的。随着 T-DNA 与其他必需的遗传成分之间无

物理连锁等特点的发现，应用根癌农杆菌作为遗传工程工具也取得了突破性进展［41，42］。由此开发出了双元载体系统，在该系统中，去掉植物激素合成基因的Ti质粒丧失了致瘤性，又称为卸甲质粒。较小的质粒或双元质粒，既能在大肠杆菌中（*E. coli*）复制，也能在农杆菌（*Agrobacterium*）中复制，其上的T-DNA设计带有多克隆位点，便于外源DNA插入［43~47］。然而，T-DNA致瘤基因的缺失会导致可见表型的丢失，而这至今仍是鉴别细菌基因成功转化和表达的标记［48，49］。因此，为了筛选使用二元载体和卸甲农杆菌菌株，需要开发新的标记基因，为筛选转化成功与否提供标记。第一个使用的是*neo*基因（*npt*Ⅱ基因），编码新霉素磷酸转移酶Ⅱ，能使植物细胞在含有氨基糖苷类抗生素G418的培养基中生长［50，51］。随后相继开发出了其他的标记基因，包括抗潮霉素基因、抗氨甲蝶呤基因、抗双丙氨磷除草剂基因等［40］（见第2章）。

早期植物转化试验，试图将分离的Ti质粒直接转入原生质体，或利用植物启动子表达冠瘿碱或抗生素抗性基因来标记体外转化培养细胞或根瘤［50，52~54］。1984年报道了首例含重组T-DNA的转基因植株，重组的T-DNA不仅能够表达，而且能遗传给子代［55，56］。5年以后，有25种植物利用农杆菌获得转化植株［57］，然而，报道的单子叶植物只有芦笋［58］，禾谷类作物被普遍认为在农杆菌宿主范围之外。因而对影响禾谷类作物转化的重要因素，如辅助质粒或双元质粒*vir*基因、外植体类型、*vir*基因诱导子等开展了分析与优化。至1995年，相继成功获得了利用农杆菌转化的水稻［59、60］和玉米［61］，而且还报道了其他20多种单子叶植物转基因表达或形成根瘤［62］。十年来，经过对（关键）因素，如农杆菌菌株/双元载体的组合、接种和共培养条件等进一步优化，已成功地进行了粳稻、籼稻和爪哇稻、小麦和大麦的冬性及春性品种、杂交玉米、高粱、黑麦及几种牧草和草坪草等物种的农杆菌转化［63］，然而，迄今为止，还未见农杆菌成功转化燕麦和小米的任何报道（图1.1）。

3. 直接DNA导入与农杆菌介导DNA导入的优缺点

比较农杆菌介导与物理/直接导入DNA方法的优点和局限性时，可分为两类因素来考虑：首先，也是比较重要的，是要考虑所获得的转基因植物所表现的分子遗传特性；其次，是根据所需的专业设备和专业技术人员、基因型依赖性、转化效率和总量等因素考虑实验方案本身的不同要求。

尽管一些T-DNA的整合与DNA间的微同源性有关［64］，并且许多数据表明（T-DNA整合）对基因组转录活跃区存在偏好性［65~67］，但普遍认为：不论是哪种DNA导入方法，所转基因均是通过非常规重组方式整合入植物核基因组，在一定程度上细胞自身的DNA修复机制起了辅助作用。许多学者开展了转基因分子整合模式的研究并发现这种整合存在一些共同的趋势。由于所转化的植物物种、使用的农杆菌菌株/双元载体组合、轰击参数和组培方案等实验条件之间的差异，使得不同实验之间难以直接比较。比较清楚的是两种DNA导入方法所获得的转化植株都可具有多拷贝、重排目的基因。但是，就一般更简单的整合方式而言，多数学者注重农杆菌介导法的优势［65~67］。例如，通过对农杆菌介导法和基因枪法分别获得的水稻转化株进行比较，发现两

者所转基因的拷贝数平均值分别为 1.8 和 2.7 [71]。此外，前者含有完整表达盒的植株所占的比例较高，株系间 GUS 表达的变化较小 [71]。大麦中一项类似的比较研究发现农杆菌介导法所获得的转基因株系携带 1~3 个拷贝；而基因枪法所获得的转基因株系中，60% 株系整合的基因拷贝数多达 8 个以上 [72]。在玉米中，与基因枪法所获得的转基因株系相比，农杆菌介导法所获得的转基因玉米不仅基因拷贝数较低，而且所转基因的表达量更高且更稳定 [73]。对不同实验室农杆菌介导法所获得的转基因小麦株系的分析表明，其中 30%~68% 是单拷贝 [74~78]。相比之下，对基因枪法所获得的转基因小麦株系分子分析它们具有更多的转基因拷贝数和插入重组 [79, 80]，类似的情况也存在于燕麦中 [81, 82]。

与这些观点相悖的是，大量的报告显示在由农杆菌介导法所获得的转基因植株中发现了多余的、双元载体的骨架 DNA。在小麦中，所测试的 2/3 株系携有 T-DNA 边界以外的一些 DNA [75]；相似地，在大麦中为 48% [83]；在水稻中为 45%~70% [84~86]。然而，研究表明，利用一个具有多拷贝左边界重复序列的双元载体可抑制非 T-DNA 骨架序列整合至水稻中 [87]。一种使转化“干净”的替代方法是，在直接法导入 DNA 之前，用物理的方法将 DNA 上无关的骨架序列除去。例如，与利用等量的超螺旋质粒相比，通过基因枪法将线性的、最小的表达盒导入水稻可获得更为简单的基因整合方式 [88, 89]。

正如在本书各章节中可以看到的，无论是利用基因枪法还是农杆菌法导入 DNA，禾谷类作物的遗传转化方案都是相当复杂和专业的。然而，这些明显的差异对转化效率和产量存在影响。与常规基因枪法共转化不同，质粒上的候选基因和标记基因表达盒相比，根据所用的载体系统，将候选基因克隆到合适的双元载体，再将载体转入合适的农杆菌菌株，这些都不可避免地涉及更多的操作步骤。

然而，一旦农杆菌菌株制备完成，大批量的转化还是相对比较容易的，而基因枪每次轰击只能处理 50 个外植体，这是基因枪法的一个技术瓶颈。基因枪法的一个优势在于其本身是一项物理过程，利用了生物体共同的 DNA 修复机制，而且不依赖于农杆菌和寄主植物细胞之间 T-DNA 成功转移所必需的特殊的生物互作。对于多数物种来说，农杆菌仅适合于有限的基因型范围，而基因枪法则不受基因型的约束，并可将 DNA 导入各种各样的单细胞或组织里，包括那些传统上认为难以获得的组织细胞，如茎尖分生组织中正在分裂的细胞 [90]。

4. 胚性细胞遗传转化和组织培养遗传转化方法的优缺点

正如第 1~3 节中所讨论的，利用基因枪轰击或农杆菌介导法将基因导入胚性组织细胞，再由转基因细胞再生出植株，由此科学家们首次建立了稳定且可靠的小粒禾谷类作物遗传转化技术。尽管这些方法在大规模商业化作物基因工程项目中行之有效，但它们确实存在一些固有的缺陷，这就需要我们对研发替代的转化方法具有持久的兴趣。上述两种转化方法的主要缺陷是，要求被转化的禾谷类品种具备良好的组培响应能力，也就是说它必须有可能以合适的频率起始再生培养，且其组培响应能力必须足够强以承受

基因导入和转化筛选的胁迫，而又无再生能力的损失。正如第 5 节中讨论的，禾谷类作物组培响应能力有着非常显著的基因型依赖性，实际结果表明至今仍有许多优良品种的转化频率还不符合要求。第二个缺点就是基于组培的转化方法，再生植株中可能会产生一些意外的组培诱导的变异（即体细胞无性系变异）。体细胞组培的再生植株中可能会表现出一些变异，包括染色体畸变、基因点突变、转座因子的激活、表观遗传变异和生理障碍等［5］。通过选准原代外植体、最小化组培时间及其他措施可以降低这类变异的发生率，但转基因植株群体中仍会出现一定背景频率的“变异”植株。

为避开组培，人们一直致力于研发直接转化胚性细胞的方法，这类细胞，如分生组织细胞、小孢子或胚珠，均可以直接发育成植株。然而，有关直接转化胚性细胞的研究成效甚微，直至人们发现，农杆菌有可能转化正在萌发的拟南芥种子［91］，随后研究者又发现用农杆菌浸染拟南芥花序也能产生转化体株［92］。最近，这种以种子或正发育的小穗中胚性细胞为受体材料的植物原位转化方法已在小麦上获得成效（［93~95］和第 6 章）。这是一个重要的进展，因为胚性细胞转化法可在某些方面优于组培转化法。对于此类转化方法，再生能力的基因型依赖性和转基因组植株的体细胞变异都不再成为限制因素，而且也避开了准备外植体和启动组培等劳动密集型步骤。这类方法也许可以在干净的温室里操作而无需无菌的实验室条件，但看上去矛盾的是，在有转基因防护条件的实验室里进行转基因操作要比在温室里更容易成功。尽管植物原位转化法具有一些优点，但能否得到普遍应用还很难说。至今没有足够的实验来获悉这种方法是否受基因型限制及其通常所能达到的转化效率。此外，利用小穗转化时，植株的生长环境和发育阶段会影响转化效率，而且在植物正常生长所必需的条件下，栽培植物也可能并非易事。

5. 基因型依赖性、再生和增强转化的基因

在所有的植物细胞培养体系中，都存在离体反应和再生能力方面的基因型差异，这显然影响到基于组培的转化效率。整体而言，谷类作物长期以来被视为难以离体操作和再生的植物种类，尽管目前已由一系列的外植体材料成功发展了所有主要谷类作物的再生体系，其中包括未成熟胚、叶片、分生组织及最近发展的成熟种子再生体系，但在应用这些再生体系的时候都存在基因型限制，这些再生体系仅在合适的基因型范围中才真正有效。

这种再生效率对基因型的依赖性，反过来限制了其遗传转化的应用，因为在所有基于组织培养的转化系统中，不管是使用 DGT 还是使用农杆菌介导的遗传转化体系，其影响转化效率的主要因素是组培响应能力和再生能力。科学家们在优化组织培养和遗传转化方案上投入了大量的精力，使得其效率获得稳步提高，但基因型依赖性仍然是一个重要的限制因素。这个因素对于研究来说是不太重要的，因为在研究中可选用适合的“模式”基因型；但对于商业应用来说，则必须选用优良品种。许多农业生物技术公司面对基因型依赖性问题时所采取的办法是，利用合适的基因型建立高通量遗传转化流水线，随后杂交筛选导入优良的育种材料以便进一步研发。尽管这提供了一个可行的解决

方案，但科学家们对减少基因型依赖性仍然保有浓厚兴趣，这种兴趣一方面对于研发植物原位转化技术避免离体组培的基因型效应具有促进作用；另一方面，对基因型在再生能力和转化效率变化的控制因素的研究也具有促进作用。

组培再生响应的遗传学机制在一些谷类作物品种中已有研究，特别是已经鉴定了水稻和玉米组培启动与再生相关的 QTL、数量性状基因位点［96，97］，还发展了组培响应有关 QTL 的近等基因系，并弄清楚了其在组培育种中的潜在价值［96］。一些植物组培 QTL 的主效基因已被鉴定，例如，在水稻中，研究表明铁蛋白-亚硝酸还原酶基因表达水平的差异，是组培响应和组培不响应品种之间再生能力存在差异的原因［98］。与整体植物遗传方式相似，基因表达分析被用于确定参与组培启动和再生过程的关键基因。迄今为止，主要的研究进展是在拟南芥中取得的，在其根和芽的形态发生过程中鉴定出大量差异表达的基因［99］，而参与调控上述过程的候选基因正在进行分析［100］。相似的方法也在被用于鉴定参与谷类作物组培再生的基因［101］，这类基因一旦被鉴定，将有助于发展再生能力的分子标记，通过杂交或遗传转化将它们导入优良育种材料可能可以提高这些优良品系的再生和转化潜力。

6. 应用异源启动子调控基因表达

应用转基因方法改良植物表型的挑战之一是利用顺式调控元件来获得预期的基因表达模式。广义上来讲，一个基因存在许多影响基因表达的顺式调控元件，包括位于上、下游较远的增强子元件、自身包含核心序列和响应元件等的启动子、5′和 3′非翻译区、内含子、多聚腺苷酸化信号等。但是，相比其他调控元件，研究大多放在启动子和内含子序列的鉴定上，而且在实际应用中，启动子的选择是决定转基因表达成败的一个主要因素。有一种很诱人的设想认为，在一个物种中具有明确表达模式的基因启动子可以通过遗传转化在另一个物种中应用，并模拟产生同样的表达模式。然而，尽管存在许多跨物种，甚至是跨生物界起作用的启动子，但在特异性表达模式上可能发生主要的、出乎意料的变化。常见的做法是在应用之前，利用报告基因，通过遗传转化实验对新启动子元件进行测试（见第 3 章）。第 11 章详细介绍了用于谷类作物遗传转化的框架、组织特异性和诱导性启动子的相关知识现状，并列举了此前用于转基因小麦、燕麦或大麦的所有已知的启动子。

7. 实质等同性

应用转基因技术改变作物性状的一个内在问题，除了所转基因获得表达外，还可能引起其他意想不到的基因表达的变化，这可能对农艺性状或营养特性产生不必要的影响。转基因插入通过一定的机制可能导致意外的变异；目前的遗传转化方法，无论是基于农杆菌还是基因枪法，都涉及目的基因随机插入到受体基因组的问题，这可能破坏受体基因组上原本的基因，或所转基因的表达可能对内源基因的表达产生多重影响。

过去25年植物转基因的经验表明，正如所预期的，这种影响的频率很低，遗传改良所造成的潜在多效性现象并不仅仅局限于转基因技术，传统育种也可能发生。然而，转基因作物受到一定程度的严格审查，这些审查并未涉及其他遗传改良方法所培育的品种，如化学诱变或辐射诱变育成的品种。这些方法可诱使植物基因组大范围的断裂，但其在近一个世纪的植物育种中并没有导致重大的食品安全问题。然而，一些非政府组织和团体已针对转基因食品的安全性，从根本上反对转基因作物在农业生产中的应用，这使消费群体更加关注转基因作物，也使监管机构提高了监管等级。

在20世纪90年代初，世界卫生组织/粮农组织（WHO/FAO）和经济合作与发展组织（OECD）意识到并认为有必要建立标准的安全评估方法，以确保转基因食品的安全［102］；1993年，经济合作与发展组织（OECD）发表了一份公文，标题为《现代生物技术食品的安全性评价：理念与原则》［103］，其中建议把“实质等同性”的概念作为评估转基因食品安全性的方法。实质等同性的基本原理是，如果一个新型转基因（GM）食品与来自标准作物品种的同类食品之间不存在显著差异，那么就没有理由认为该新型食品是不安全的。

关于实质等同性的定义、解释及其作为转基因食品安全性评估基础的适用性存在较多的争论［104，105］，实质等同性概念已被欧盟食品安全性评估与美国食品和药物管理局（FDA）应用，但二者应用的方式迥然不同［106］。然而，实质等同性现已被普遍地当作新型食品安全性评价的起点，其条件是它并不是食品安全性评估本身，而是一种用来评估新型食品与其标准品之间差异的方法，之后根据需要，进行进一步分析以便确立这些差异对食品安全的意义和范围，并着重于那些已知对健康有影响的成分，如会引发过敏的或有毒性的分子［106］。

针对应用于转基因食品安全性评价的实质等同性，早期的反对意见之一是认为许多传统食品的生化和营养构成尚不明确，对于不同品种之间变异的程度及环境效应对食品成分的改变程度了解极少。在技术层面上，如果不是针对某种特定的食品组分（如储藏蛋白）进行分析，而是应用标准的生化分析技术找出食品中数百种不同代谢产物的变化是相当困难的。然而，近年来在转录组、蛋白质组和代谢物组水平上，大规模分析生物样品的技术已取得了非常显著的进步（详见第16~18章），这使得人们有可能在“总体”水平上，比较新食品样本和传统对照样本之间的差异，而不是仅仅分析所选定的基因、蛋白质或代谢物的变化。目前，这些规模化的新的分析技术，特别是采用核磁共振（NMR）方法的代谢谱分析技术，正用于评估标准作物与转基因作物、转基因食品与传统食品之间的实质等同性［107］。近期的文献表明，在禾谷类作物中，这些技术已应用于玉米［108，109］、水稻［110］和小麦的研究［107］。

8. 筛选基因和报告基因的使用

多数植物转化的效率较低，因此，需要有一个系统去识别那些少量的转基因细胞，并促使这些少数细胞能在那些占绝大多数的未转化细胞中生存下来。可以根据表达的筛选特性是正向选择还是负向选择，以及是否需在培养基中添加额外成分，分类选择标

记。常用的选择标记是使细胞在抗生素或除草剂条件下生长的某些酶类基因。在禾谷类作物转基因操作过程中，已应用了多种不同的其他筛选方法，有关的综述见文献［111，112］，并将在本书第2章进一步讨论。

为了直观地检测转基因植物，优化实验方案或研究特异性调控序列对基因表达的影响，通常在转化实验中使用非选择性的报告基因，或可量化的标记基因。常用的可视化报告基因有 *uidA* 基因、*Luc* 基因和 *gfp* 基因，分别编码β-葡萄糖醛酸酶、萤光素酶和绿色荧光蛋白。此外，还有其他一些报告基因业已成功地应用，将在第3章中讨论这些报告基因在小粒禾谷类作物转基因研究中的优点。

（张恒木　王建军　译）

参考文献

1. Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. and Sanford, J. C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature* 327, 70-73.
2. Gordonkamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., Obrien, J. V., Chambers, S. A., Adams, W. R., Willetts, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P. and Lemaux, P. G. (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2, 603-618.
3. Gheysen, G., Angenon, G. andVan Montagu, M. (1998) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications in transgenic plant research, in *Transgenic Plant Research* (Lindsey, K., ed.) Harwood Academic, The Netherlands, pp. 1-33.
4. Potrykus, I. (1990) Gene transfer to cereals-an assessment. *Bio-Technology* 8, 535-542.
5. Lazzeri, P. A. and Shewry, P. R. (1993) Biotechnology of cereals. *Biotechnol. Genetic Eng Rev.* 11, 79-146.
6. Barcelo, P. and Lazzeri, P. (1998) Direct gene transfer: chemical, electrical and physical methods, in *Transgenic Plant Research*, (Lindsey, K., ed.), Harwood Academic, The Netherlands, pp. 35-55.
7. Finer, J. J., Finer, K. R. and Ponappa, T. (1999) Particle bombardment mediated transformation, in *Plant Biotechnology Vol.* (Hammond, J., Mcgarvey, P., and Yusibov, V., ed.) Springer-Verlag, New York, pp. 59-80.
8. Kikkert, J. R. (1993) The Biolistic (R) Pds1000 He Device. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* . 33, 221-226.
9. Mendel, R. R., Muller, B., Schulze, J., Kolesnikov, V. and Zelenin, A. (1989) Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theor Appl Genet*. 78, 31-34.
10. Kartha, K. K., Chibbar, R. N., Georges, F., Leung, N., Caswell, K., Kendall, E. and Qureshi, J. (1989) Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (cat) gene in barley cell-cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep*. 8, 429-432.
11. Vasil, V., Brown, S. M., Re, D., Fromm, M. E. and Vasil, I. K. (1991) Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell-suspension cultures of wheat. *Bio-Technology* 9, 743-747.
12. Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E. and Vasil, I. K. (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryo-genic callus. *Bio-*

Technology 10, 667-674.

13. Nehra, N. S., Chibbar, R. N., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C., Steinhauer, L., Baga, M. and Kartha, K. K. (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant J.* 5, 285-297.
14. Weeks, J. T., Anderson, O. D. and Blechl, A. E. (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 102, 1077-1084.
15. Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994) Fertile transgenic wheat from micro-projectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5, 299-307.
16. Wan, Y. C. and Lemaux, P. G. (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 104, 37-48.
17. Hagio, T., Hirabayashi, T., Machii, H. and Tomotsune, H. (1995) Production of fertile transgenic barley Hordeum vulgare L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Rep.* 14, 329-334.
18. Ritala, A., Aspegren, K., Kurten, U., Salmenkalliomarttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T. H. and Enari, T. M. (1994) Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant MolBiol.* 24, 317-325.
19. Jahne, A., Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor Appl Genet.* 89, 525-533.
20. He, G. Y., Rooke, L., Steele, S., Bekes, F., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R., Barcelo, P., Shewry, P. R. and Lazzeri, P. A. (1999) Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Mol Breed.* 5, 377-386.
21. Folling, L. and Olesen, A. (2001) Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 20, 629-636.
22. Barcelo, P., Hagel, C., Becker, D., Martin, A. and Lorz, H. (1994) Transgenic cereal (Tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *Plant J.* 5, 583-592.
23. Cho, M. J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. (1999) High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Sci.* 148, 9-17.
24. Torbert, K. A., Rines, H. W. and Somers, D. A. (1998) Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures. *Crop Sci.* 38, 226-231.
25. Gless, C., Lorz, H. and Jahne-Gartner, A. (1998) Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments. *J Plant Physiol.* 152, 151-157.
26. Zhang, S., Cho, M. J., Koprek, T., Yun, R., Bregitzer, P. and Lemaux, P. G. (1999) Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Rep.* 18, 959-966.
27. Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V., Stoger, E. and Vasil, I. K. (1996) Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants. *Plant Cell Rep.* 16, 12-17.
28. Barro, F., Cannell, M. E., Lazzeri, P. A. and Barcelo, P. (1998) The influence of auxins on transformation of wheat and Tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theor. Appl. Genet*. 97, 684-695.
29. Harwood, W. A., Ross, S. M., Cilento, P. and Snape, J. W. (2000) The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vul-*

gare). *Euphytica* 111, 67-76.

30. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (1999) Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep.* 19, 118-127.
31. Zhou, H., Arrowsmith, J. W., Fromm, M. E., Hironaka, C. M., Taylor, M. L., Rodriguez, D., Pajeau, M. E., Brown, S. M., Santino, C. G. and Fry, J. E. (1995) Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Rep.* 15, 159-163.
32. Reed, J., Privalle, L., Powell, M. L., Meghji, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Wenck, A., Launis, K., Kramer, C., Chang, Y. F., Hansen, G. and Wright, M. (2001) Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Plant* 37, 127-132.
33. Koprek, T., Hansch, R., Nerlich, A., Mendel, R. R. and Schulze, J. (1996) Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Sci.* 119, 79-91.
34. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Cannell, M., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J Exp Bot.* 52, 865-874.
35. Smith, E. F. and Townsend, C. O. (1907) A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.
36. Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant-cells-molecular-basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11, 263-271.
37. Escobar, M. A. and Dandekar, A. M. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci*. 8, 380-386.
38. Gelvin, S. B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 51, 223-256.
39. Zambryski, P. C. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium* plant cell-DNA ransfer story. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. MolBiol*. 43, 465-490.
40. Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol*. 19, 15-38.
41. Deframond, A. J., Barton, K. A. and Chilton, M. D. (1983) Mini-Ti-a new vector strategy for plant genetic engineering. *Bio-Technology* 1, 262-269.
42. Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of Vir-region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
43. Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res*. 12, 8711-8721.
44. Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Lee-mans, J., Vanmontagu, M. and Schell, J. (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J*. 2, 2143-2150.
45. Simoens, C., Alliotte, T., Mendel, R., Muller, A., Schiemann, J., Vanlijsebettens, M., Schell, J., Vanmontagu, M. and Inze, D. (1986) A binary vector for transferring genomic libraries to plants. *Nucleic Acids Res*. 14, 8073-8090.
46. An, G., Watson, B. D., Stachel, S., Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1985) New cloning vehicles

for transformation of higher-plants. *EMBO J.* 4, 277-284.

47. Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Eichholtz, D. A., Flick, J. S., Fink, C. L., Hoffmann, N. L. and Sanders, P. R. (1985) The SEV system-a new disarmed ti-plasmid vector system for plant transformation. *Bio-Technology* 3, 629-635.
48. Hernalsteens, J. P., Vanvliet, F., Debeuckeleer, M., Depicker, A., Engler, G., Lemmers, M., Holsters, M., Vanmontagu, M. and Schell, J. (1980) The *Agrobacterium tumefaciens* ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant-cells. *Nature* 287, 654-656.
49. Marton, L., Wullems, G. J., Molendijk, L. and Schilperoort, R. A. (1979) *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277, 129-131.
50. Herrera-Estrella, L., Deblock, M., Messens, E., Hernalsteens, J. P., Vanmontagu, M. and Schell, J. (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987-995.
51. Bevan, M. W., Flavell, R. B. and Chilton, M. D. (1983) A chimaeric antibiotic-resistance gene as a selectable marker for plant-cell transformation. *Nature* 304, 184-187.
52. Davey, M. R., Cocking, E. C., Freeman, J., Pearce, N. and Tudor, I. (1980) Transformation of petunia protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. *Plant Sci. Lett.* 18, 307-313.
53. Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J. and Schilperoort, R. A. (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with tiplasmid DNA. *Nature* 296, 72-74.
54. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Vanmontagu, M. and Schell, J. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant-cells using a ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.
55. Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A. and Hoffmann, N. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223, 496-498.
56. Deblock, M., Herreraestrella, L., Vanmontagu, M., Schell, J. and Zambryski, P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.* 3, 1681-1689.
57. Gasser, C. S. and Fraley, R. T. (1989) Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244, 1293-1299.
58. Bytebier, B., Deboeck, F., Degreve, H., Vanmontagu, M. and Hernalsteens, J. P. (1987) T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. *P. N. A. S. USA* 84, 5345-5349.
59. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282.
60. Chan, M. T., Chang, H. H., Ho, S. L., Tong, W. F. and Yu, S. M. (1993) *Agrobacterium*mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter beta-glucuronidase gene. *Plant Mol Biol.* 22, 491-506.
61. Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E. C., Peterson, G. and Smith, R. H. (1991) Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.* 95, 426-434.
62. Smith, R. H. and Hood, E. E. (1995) *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci.* 35, 301-309.
63. Cheng, M., Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, X. D. and Armstrong, C. L. (2004) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cell. Develop. Biol-Plant* 40, 31-45.
64. Brunaud, W., Balzergue, S., Dubreucq, B., Aubourg, S., Samson, F., Chauvin, S., Bechtold, N., Cruaud, C., DeRose, R., Pelletier, G., Lepiniec, L., Caboche, M. and Lecharny, A. (2002) T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep.* 3,

1152-1157.

65. Valentine, L. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: The David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiol*. 133, 948-955.

66. Kohli, A., Twyman, R. M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E. and Christou, P. (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol*. 52, 247-258.

67. Bajaj, S. and Mohanty, A. (2005) Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotech J*. 3, 275-307

68. Shrawat, A. K. and Lorz, H. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotech J*. 4, 575-603.

69. Gelvin, S. B. (2003) *Agobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol Rev*. 67, 16-37

70. Jones, H. D. (2005) Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J Cereal Sci* . 41, 137-147.

71. Dai, S. H., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S. P., Tian, W. Z., Chen, S. Y., Beachy, R. N. and Fauquet, C. (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed* . 7, 25-33.

72. Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W. and Harwood, W. A. (2005) A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep*. 23, 780-789.

73. Shou, H. X., Frame, B. R., Whitham, S. A. and Wang, K. (2004) Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed*. 13, 201-208.

74. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B. and Jones, H. D. (2003) Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep*. 21, 659-668.

75. Wu, H., Sparks, C. A. and Jones, H. D. (2006) Characterisation of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by *Agrobacterium*mediated transformation. *Mol Breed* . 18, 195-208.

76. Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S. Z., Zhou, H. P., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. and Wan, Y. C. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*. 115, 971-980.

77. Cheng, M., Hu, T. C., Layton, J., Liu, C. N. and Fry, J. E. (2003) Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 39, 595-604.

78. Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F. and Fry, J. (2003) *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep*. 21, 1010-1019.

79. Rooke, L., Steele, S. H., Barcelo, P., Shewry, P. R. and Lazzeri, P. A. (2003) Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. *Euphytica* 129, 301-309.

80. Howarth, J. R., Jacquet, J. N., Doherty, A., Jones, H. D. and Cannell, M. E. (2005) Molecular genetic analysis of silencing in two lines of *Triticum aestivum* transformed with the reporter gene construct pAHC25. *Annals Appl Biol*. 146, 311-320.

81. Makarevitch, I., Svitashev, S. K. and Somers, D. A. (2003) Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol*. 52, 421-432.

82. Svitashev, S. K., Pawlowski, W. P., Makarevitch, I., Plank, D. W. and Somers, D. A. (2002)

Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant trans-gene rearrangement. *Plant J*. 32, 433-445.

83. Lange, M., Vincze, E., Moller, M. G. and Holm, P. B. (2006) Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*. 25, 815-820.
84. Kim, S. R., Lee, J., Jun, S. H., Park, S., Kang, H. G., Kwon, S. and An, G. (2003) Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol. Biol*. 52, 761-773.
85. Afolabi, A. S., Worland, B., Snape, J. W. and Vain, P. (2004) A large-scale study of rice plants transformed with different T-DNAs provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theor Appl Genet*. 109, 815-826.
86. Vain, P., Afolabi, A. S., Worland, B. and Snape, J. W. (2003) Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/ pSoup. *Theor Appl Genet*. 107, 210-217.
87. Kuraya, Y., Ohta, S., Fukuda, M., Hiei, Y., Murai, N., Hamada, K., Ueki, J., Imaseki, H. and Komari, T. (2004) Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Breed*. 14, 309-320.
88. Fu, X. D., Duc, L. T., Fontana, S., Bong, B. B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R. M., Christou, P. and Kohli, A. (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copynumber transgenic plants with simple integration patterns. *Transgen Res*. 9, 11-19.
89. Agrawal, P. K., Kohli, A., Twyman, R. M. and Christou, P. (2005) Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Mol. Breed*. 16, 247-260.
90. Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P. J., Fauquet, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T. T., Nugent, G., Raemakers, K., Romano, A., Somers, D. A., Stoger, E., Taylor, N. and Visser, R. (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol Breed*. 15, 305-327.
91. Feldmann, K. A. and Marks, M. D. (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* -a non-tissue culture approach. *Mol Gen-Genet*. 208, 1-9.
92. Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium*-mediated Ge. e-transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 316, 1194-1199.
93. Craze, M. and Risacher, T. (2000) Plant Transformation Method. Patent No. WO 00/63398.
94. Zale, J. M. and Steber, C. M. (2006) *In planta* transformation of wheat as a genomics tool, in *Proceedings of the Plant and Animal Genomics XIV Conference*, Jan 14-18, 2006, San Diego, USA.
95. Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., Nozue, M. and Kojima, M. (2006) Development of simple and efficient in Planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biosci Bioeng*. 102, 162-170.
96. Taguchi-Shiobara, F., Yamamoto, T., Yano, M. and Oka, S. (2006) Mapping QTLs that control the performance of rice tissue culture and evaluation of derived near-isogenic lines. *Theor Appl Genet*. 112, 968-976.

97. Krakowsky, M. D., Lee, M., Garay, L., Woodman-Clikeman, W., Long, M. J., Sharopova, N., Frame, B. and Wang, K. (2006) Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*. 113, 821-830.

98. Nishimura, A., Ashikari, M., Lin, S., Takashi, T., Angeles, E. R., Yamamoto, T. and Matsuoka, M. (2005) Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *P. N. A. S. USA* 102, 11940-11944.

99. Che, P., Lall, S., Nettleton, D. and Howell, S. H. (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Physiol*. 141, 620-637.

100. DeCook, R., Lall, S., Nettleton, D. and Howell, S. H. (2006) Genetic regulation of gene expression during shoot development in Arabidopsis. *Genetics* 172, 1155-1164.

101. Che, P., Love, T. M., Frame, B. R., Wang, K., Carriquiry, A. L. and Howell, S. H. (2006) Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol. Biol*. 62, 1-14.

102. Joint FAO/WHO Consultation on the Assessment of Biotechnology in Food Production and Processing as Related to Food Safety (1990) Geneva S, Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology: report of a joint FAO/WHO consultation, Geneva, 5-10 November 1990.

103. OECD (1993) Organisation for Economic Co-operation and Development. Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology-Concepts and Principles, OECD, Paris.

104. Kuiper, H. A., Kleter, G. A., Noteborn, H. and Kok, E. J. (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J*. 27, 503-528.

105. Konig, A., Cockburn, A., Crevel, R. W. R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H. A., Peijnenburg, A., Penninks, A. H., Poulsen, M., Schauzu, M. and Wal, J. M. (2004) Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem Toxicol* . 42, 1047-1088.

106. Levidow, L., Murphy, J. and Carr, S. (2007) Recasting "substantial equivalence": transatlantic governance of GM food. *Science TechnolHuman Values* 32, 53-91.

107. Baker, J. M., Hawkins, N. D., Ward, J. L., Lovegrove, A., Napier, J. A., Shewry, P. R. and Beale, M. H. (2006) A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Bio Tech J*. 4, 381-392.

108. Manetti, C., Bianchetti, C., Bizzari, M., Casciani, L., Castro, C., D' Ascenzo, G., Delfini, M., Di Cocco, M. E., Lagana, A., Miccheli,. A., Motto, M. and Conti, F. (2004) NMR-based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochem*. 65, 3187-3198.

109. Herman, R. A., Storer, N. P., Phillips, A. M., Prochaska, L. M. and Windels, P. (2007) Compositional assessment of event DAS59122-7 maize using substantial equivalence. *Regul Toxicol Pharmacol* . 47, 37-47.

110. Oberdoerfer, R. B., Shillito, R. D., De Beuckeleer, M. and Mitten, D. H. (2005) Rice (*Oryza sativa* L.) containing the bar gene is compositionally equivalent to the nontransgenic counterpart. *J Agr Food Chem*. 53, 1457-1465.

111. Miki, B. and McHugh, S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*. 107, 193-232.

112. Wilmink, A. and Dons, J. J. M. (1993) Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol Biol Report* . 11, 165-185.

97. Krakowsky, M. D., Lee, M., Garay, L., Woodman-Clikeman, W., Long, M. J., Sharopova, N., Frame, B. and Wang, K. (2006) Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 113, 821-830.
98. Nishimura, A., Ashikari, M., Lin, S., Takashi, T., Angeles, E. R., Yamamoto, T. and Matsuoka, M. (2005) Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *P. N. A. S. USA* 102, 11940-11944.
99. Che, P., Lall, S., Nettleton, D. and Howell, S. H. (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Physiol*, 141, 620-637.
100. DeCook, R., Lall, S., Nettleton, D. and Howell, S. H. (2006) Genetic regulation of gene expression during shoot development in Arabidopsis. *Genetics* 172, 1155-1164.
101. Che, P., Love, T. M., Frame, B. R., Wang, K., Carriquiry, A. L. and Howell, S. H. (2006) Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol Biol* 62, 1-14.
102. Joint FAO/WHO Consultation on the Assessment of Biotechnology in Food Production and Processing as Related to Food Safety (1990) Geneva S., Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology: report of a joint FAO/WHO consultation, Geneva, 5-10 November 1990.
103. OECD (1993) Organisation for Economic Co-operation and Development. Safety Evaluation of Foods derived by Modern Biotechnology-Concepts and Principles, OECD, Paris.
104. Kuiper, H. A., Kleter, G. A., Noteborn, H. and Kok, E. J. (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J*, 27, 503-528.
105. Konig, A., Cockburn, A., Crevel, R. W. R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H. A., Peijnenburg, A., Penninks, A. H., Poulsen, M., Schauzu, M. and Wal, J. M. (2004) Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem Toxicol*, 42, 1047-1088.
106. Levidow, L., Murphy, J. and Carr, S. (2007) Recasting "substantial equivalence": transatlantic governance of GM food. *Science Technol Human Values* 32, 53-91.
107. Baker, J. M., Hawkins, N. D., Ward, J. L., Lovegrove, A., Napier, J. A., Shewry, P. R. and Beale, M. H. (2006) A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Bio Tech J*, 4, 381-392.
108. Manetti, C., Bianchetti, C., Bizzarri, M., Casciani, L., Castro, C., D'Ascenzo, G., Delfini, M., Di Cocco, M. E., Lagana, A., Miccheli, A., Motto, M. and Conti, F. (2004) NMR-based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochem*, 65, 3187-3198.
109. Herman, R. A., Storer, N. P., Phillips, A. M., Prochaska, L. M. and Windels, P. (2007) Compositional assessment of event DAS-59122-7 maize using substantial equivalence. *Regul Toxicol Pharmacol*, 47, 37-47.
110. Oberdoerfer, R. B., Shillito, R. D., De Beuckeleer, M. and Mitten, D. H. (2005) Rice (*Oryza sativa* L.) containing the bar gene is compositionally equivalent to the nontransgenic counterpart. *J Agr Food Chem*, 53, 1457-1465.
111. Miki, B. and McHugh, S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*, 107, 193-232.
112. Wilmink, A. and Dons, J. J. M. (1993) Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol Biol Report*, 11, 165-185.

第二篇　转化与再生

第2章 转基因植株的选择

Huw D. Jones　Caroline A. Sparks

摘　要：外源基因整合到宿主细胞的概率低且随机发生，加之这些极少的转基因细胞很难再生获得完整植株，因此，转基因试验中利用选择标记基因已成为常态。对于那些不用于田间栽培的转基因研究而言，通常选用高抗除草剂或抗生素的选择标记。本章以除草剂草铵膦抗性选择标记基因为例，说明小麦基因枪或农杆菌转化中的选择过程。

关键词：选择标记基因，选择，除草剂，抗生素，Basta，bar，pat，草铵膦，G418

1. 引言

在各种生物的转基因体系发展过程中，显性选择标记基因是尤为重要的关键因子。选择标记基因所编码的蛋白质，可使遗传转化细胞比多数未转化细胞更具生长优势，从而使极少的转化细胞更易鉴别。通常情况下，选择系统由两部分组成：一是化学药剂，如除草剂、抗生素或某种特殊的碳源，它们通常添加到组织培养基中；二是整合于转基因盒中的标记基因，在特定的培养基条件下使转化细胞具有选择优势。表2.1所列为作物转基因过程中常用的选择药剂和相应的选择标记基因。传统的植物转基因操作中，在添加了致死浓度的除草剂（如草铵膦或草甘膦）或者抗生素（如氨基糖苷类）的环境下，利用 *bar* 基因、*epsps* 基因、*npt* Ⅱ和 *hpt* 基因，使转化细胞能够存活下来。近年来，发展了一种替代的新方法，标记基因使转化细胞在糖代谢或氨基酸代谢过程中具有选择优势。这种选择通常被称为“正向选择”（见注2），认为其对实验操作中的研究人员是安全的；如果将该方法获得的转基因植物在田间种植，对环境也是安全的。*Pmi*（磷酸甘露糖异构酶）基因就是这类选择基因的一种，其促进利用甘露糖作为碳源并防止由于6-磷酸甘露糖的积累而抑制糖酵解。

表2.1　用于麦类作物稳定遗传转化的选择标记基因（基因全名见注1）

物种和DNA转化方法	选择标记基因	驱动标记基因的启动子	选择药剂	参考文献
小麦基因枪法	*bar*	*Ubi*1启动子加第1内含子	L-型草铵膦：Bialaphos、Basta等	[13，14、18，19]
	bar	*CaMV 35S*启动子有或无 *Adh*1内含子1	L-型草铵膦：Bialaphos、Basta等	[20，21，22]
	hpt	*CaMV 35S*启动子	潮霉素B	[23]
	CP4 *epsps* 和 *gox*	双 *CaMV 35S* 启动子		[24]

续表

物种和 DNA 转化方法	选择标记基因	驱动标记基因的启动子	选择药剂	参考文献
	cab	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子	氨腈（cyanamide）	[25]
	*npt*Ⅱ	带有 HSP70 内含子的增强型 *CaMV 35S* 启动子	G418	[26]
	pmi（*manA*）	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子和其他成分	甘露糖	[27]
小麦农杆菌转化法	*npt*Ⅱ	带有 HSP70 内含子的增强型 *CaMV 35S* 启动子	G418	[28]
	CP4 *epsps*	各种启动子（promoters）	草甘膦	[29, 30]
	hpt	*CaMV 35S* 启动子	潮霉素 B	[31]
	bar	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子	L-型草铵膦：Bialaphos、Basta 等	[17, 32, 33]
	pmi（*manA*）	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子和其他成分	甘露糖	[34, 35]
大麦 PEG 介导转化法	*npt*Ⅱ	*Act*1 启动子加第 1 内含子	G418	[36]
大麦 $CaCl_2$ 介导转化法	*npt*Ⅱ	*CaMV 35S* 启动子加 *Adh*1 内含子 1	G418	[37]
大麦基因枪法	*lysC*	*Ubi*1 启动子加来自于 ssRbcs 的转运多肽	赖氨酸+苏氨酸	[38]
	bar	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子	Bialaphos	[39~41]
	bar	*CaMV 35S* 启动子有或无 *Adh*1 内含子 1	Bialaphos/Basta	[42, 43]
	*npt*Ⅱ	*nos* 启动子	G418	[44]
	*npt*Ⅱ	*CaMV 35S* 启动子	生根阶段斑点印迹	[45]
	codA	水稻 *Act*1 启动子加第 1 内含子	5-氟胞嘧啶	[46]
	hpt	*CaMV 35S* 启动子	潮霉素 B	[47]
大麦农杆菌转化法	*pmi*（*manA*）	植物启动子	甘露糖	[34]
	bar	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子	Bialaphos	[48~50]
	pat	*CaMV 35S* 启动子	Bialaphos	[51]
	hpt	*CaMV 35S* 启动子加 *hpt* 基因内含子	潮霉素 B	[50, 52]
燕麦基因枪法	*npt*Ⅱ	*CaMV 35S* 启动子加 *Adh*1 内含子 1	巴龙霉素（Paromomycin）	[53, 54]
	bar	*CaMV 35S* 启动子有或无 *Adh*1 内含子 1	L-型草铵膦：Bialaphos、Basta 等	[55, 56]
	bar	*Ubi*1 启动子加第 1 内含子	Bialaphos	[57]
	hpt	水稻 *Act*1 启动子加第 1 内含子	潮霉素 B	[58]

与传统方法有所不同，禾谷类作物转化技术可以单独利用可视标记如绿色荧光蛋白（GFP）或萤光素酶（Luc），或者与传统的化学选择方法结合使用［1~8］。此外，不用任何选择标记而用 PCR 检测筛选，也可获得少量的小麦转基因植株［9］。

本书的其他章节讲述了基因枪法或农杆菌法介导的转化过程，并且提到了适合某些物种的特定选择方法。本章将详细讲述 *bar* 或 *pat* 标记基因（见注 3）及其选择药剂草铵膦（PPT）的选择步骤与过程，草铵膦是许多商业化草铵膦铵盐类广谱除草剂的活性成分（见注 4）。本章以小麦为例，但是这种选择体系也适用于大麦和燕麦（见注 5）。

2. 材料

（1）构建适宜的质粒载体，该载体包含 *bar* 或 *pat* 基因，并置于强启动子下以确保在组织培养阶段表达。一种组成型启动子可用于发芽期及生长期的选择（见注 6）。

（2）经基因枪轰击或农杆菌共培养后的幼胚（见注 7）。

（3）愈伤组织诱导培养基（2×）（见注 8）：200 ml MS 培养基的大量元素（10×），2 ml L7 培养基的微量元素（见参考文献［10］中的成分目录）（1000×），20 ml/L 硫酸亚铁螯合物（ferrous sulfate chelate）溶液（100×），200 mg/L 肌醇（myo-inositol），0. 2 mg/L 盐酸硫胺素（thiamine HCl），1. 0 mg/L 烟酸（nicotinic acid），1. 0 mg/L 盐酸吡哆醇（pyridoxine HCl）。基因枪转化诱导培养基中添加 750 mg/L 谷氨酰胺（L-glutamine）（见注 9）、150 mg/L 脯氨酸（L-proline）、100 mg/L 天冬酰胺（L-asparagine）、180 g/L 蔗糖（sucrose）（见注 10）；农杆菌转化的诱导培养基中添加 1 g/L 谷氨酰胺（L-glutamine）、200 mg/L 水解酪蛋白、3. 9 g/L MES 和 80 g/L 麦芽糖（maltose）（见注 11）。用 5 mol/L 的 NaOH 或 KOH 调节 pH 至 5. 7。渗透压控制在 800~1100 mOsmol/L。过滤除菌（见注 12）。

（4）再生培养基（2×）（见注 8）：200 ml L7 培养基的大量元素（10×），2 ml L7 培养基的微量元素（见参考文献［10］中的成分目录）（1000×），20 ml/L 硫酸亚铁螯合物（ferrous sulfate chelate）溶液（100×），400 mg/L 肌醇（myo-inositol），20 mg/L 盐酸硫胺素（thiamine HCl），2. 0 mg/L 烟酸（nicotinic acid），2. 0 mg/L 盐酸吡哆醇（pyridoxine HCl），2. 0 mg/L 泛酸钙（Ca-pantothenate），2 mg/L 抗坏血酸（L-ascorbic acid），60 g/L 麦芽糖（maltose）。用 5 mol/L 的 NaOH 或 KOH 调节 pH 至 5. 7。渗透压控制在 269~298 mOsmol/L。过滤除菌（见注 12）。

（5）凝胶剂（Sigma-Aldrich，Poole，UK）：琼脂胶（2×），10 g/L；或者植物凝胶（2×），4 g/L，高压灭菌（见注 13）。

（6）草铵膦（PPT）（见注 14）：配制为 10 mg/ml 的水溶液，过滤除菌（注 12）。

（7）DNA 提取试剂和仪器（见注 15）。

（8）PCR、电泳仪和耗材。转基因植株中检测 *bar* 基因的引物：bar1 GTC TGC ACC ATC GTC AAC C 和 bar2 GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC。

（9）商品除草剂（如 Basta、Challenge、Harvest）用于叶片涂抹检测：溶于 0. 1% 的吐温 20，其中 PPT 活性成分的浓度为 0. 2 g/L 和 2 g/L（见注 16）。

3. 方法

以下叙述的方法是依据参考文献［11~17］的工作，其经历了 10 多年的发展与应用。小麦盾片胚性愈伤组织的诱导和再生，在温度为 22℃、光周期为 12 h 的组织培养室中进行（见注 17），每个培养皿约放置 10 块愈伤组织。选择压可先从第一轮再生培养的愈伤诱导期间开始（称为“早选”），或者更为常用的是从第二轮再生培养开始（见注 18）。每隔 3 周或 4 周转接培养物时对再生情况进行评估，按只长芽、只长根或者根芽同生三种再生株进行评分。当为一个特定的植物品种筛选选择药剂时，首先要测定植物本身对于该选择药剂的抗性，这一点非常重要。可先通过致死曲线实验来确定其用于遗传转化研究的最适浓度（见注 19）。

3.1 转基因植株的生长和选择

（1）将可能含有转化细胞的幼胚盾片置于愈伤诱导培养基上培养产生愈伤组织，诱导培养基中添加 0.5 mg/L 2，4-D（见注 20）和 10 mg/L $AgNO_3$（见注 21）。对农杆菌处理过的培养物，培养基中还应加入 2 mg/L 毒莠定和 160 mg/L 特美汀（见注 22），愈伤组织诱导培养在黑暗条件下进行（见注 17），同时在这一阶段可加入选择剂 2~6 mg/L 草铵膦。

（2）3 或 4 周后（见注 23）将愈伤组织从诱导培养基转移至第一轮再生培养基，添加 0.1 mg/L 2，4-D（见注 20）、25 mg/L $CuSO_4$（见注 24）和 5 mg/L 玉米素，并在持续的光照条件下培养（见注 17）。对农杆菌处理过的培养物，还要加入 160 mg/L 特美汀（见注 22）。可在这一阶段加入选择剂草铵膦 2~6 mg/L（见注 18）。

（3）3 或 4 周后评价再生/选择反应（见注 25）。再生的愈伤组织转移至添加了 5 mg/L玉米素（见注 26）和 2~6 mg/L 选择剂草铵膦的第二轮再生培养基上继续培养 3~4 周（见注 27 和注 28）。将一半非转基因对照的愈伤组织置于添加有选择剂的再生培养基上培养，另一半则在无选择剂的再生培养基上培养，分别作为选择对照和非选择对照（见注 7 和图 2.1）。

（4）3 或 4 周后评价再生反应和选择反应（见注 25）。

（5）为确保降低非转基因细胞（或组织）的混入，只转移具有健壮绿芽或苗的部分至添加有 4~6 mg/L 草铵膦的再生培养基上，在 Magenta 培养盒（Sigma-Aldrich）（见注 29）中继续培养 3~4 周（见注 30）。

（6）一旦再生苗长到 10~15 cm 长并有适当的根系时，就将这些可能的转基因植株移栽到含有特制土肥的 8 cm 塑料方盆中（见注 31），并置于转基因封闭温室中生长（见注 32）。

3.2 转基因植物的分析

3.2.1 PCR 分析

（1）当植株长到合适大小时（即 3~4 张叶片），取约 2 cm 长的叶片，立即放于液

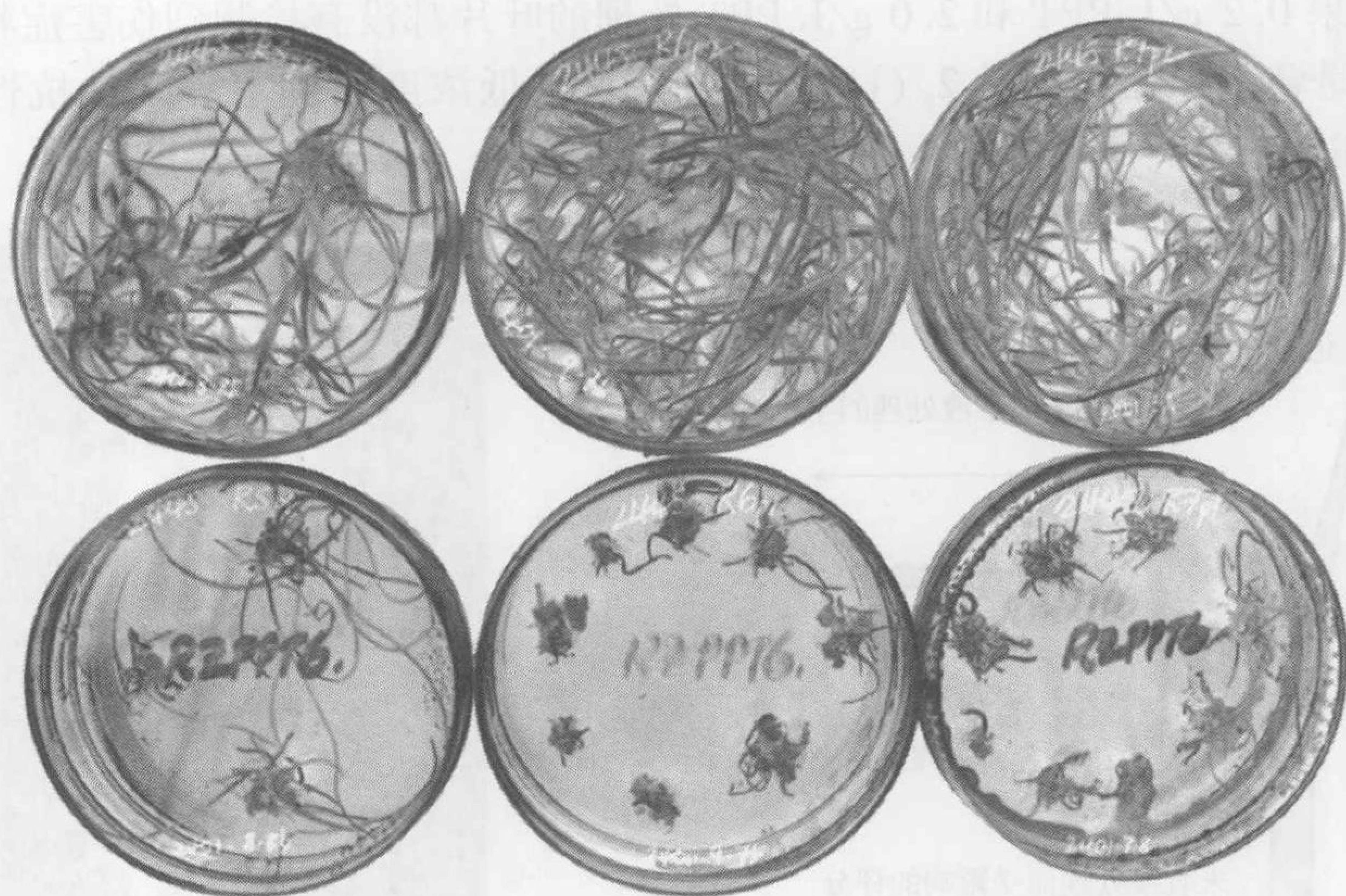


图2.1 无选择剂的再生培养基（上图）及含6 mg/L PPT的再生培养基（下图）上培养的小麦愈伤组织

氮中，抽提基因组DNA（见注33）。

（2）在液氮中将叶片磨成粉末状，并使用Wizard基因组DNA纯化试剂盒提取基因组DNA（见注15）。

（3）为了确定是否为转基因植株，利用*bar*基因引物1和引物2（见前述）对DNA做PCR分析，退火温度为57℃。

（4）将PCR阳性植株移栽到直径为13 cm的塑料盆中，并继续在转基因封闭温室中生长（见注32）。

3.2.2 除草剂叶片涂抹检测

随后的生长过程中，可利用除草剂叶片涂抹检测法对转基因植株做进一步的分析[17]。

（1）用0.1%吐温将除草剂母液（如Challenge）稀释成两种浓度，其活性成分PPT浓度分别为2.0 g/L和0.2 g/L（见注16）。

（2）每个待测植株，尽可能在不同分蘖上选择三张大小相近、生长健壮的叶片，避免取旗叶。立即在所选叶片植株的茎秆上做标记，分别标注为0.2 g/L PPT、2.0 g/L PPT和对照（0.1%吐温）处理（见注34）。

（3）用圆珠笔在每张叶片长度一半的位置做标记。用棉签蘸取适量溶液涂抹于叶片远端的半张叶片表面（见注35）。

（4）为使除草剂生效，将植株放置7天后再评估抗/感情况。

（5）在涂抹了除草剂溶液的位置，根据除草剂溶液涂抹区域干枯伤害的百分率和除草剂转运对叶片近端区域伤害的百分率，对每张处理的叶片进行评分［图2.2(a)］。

（6）如果 0.2 g/L PPT 和 2.0 g/L PPT 处理的叶片都没有检测到伤害症状，则可认为这一植株是转基因的［图 2.2（b）］；如果只在低浓度处理下表现出抗性，应当再用其他方法进行确认。

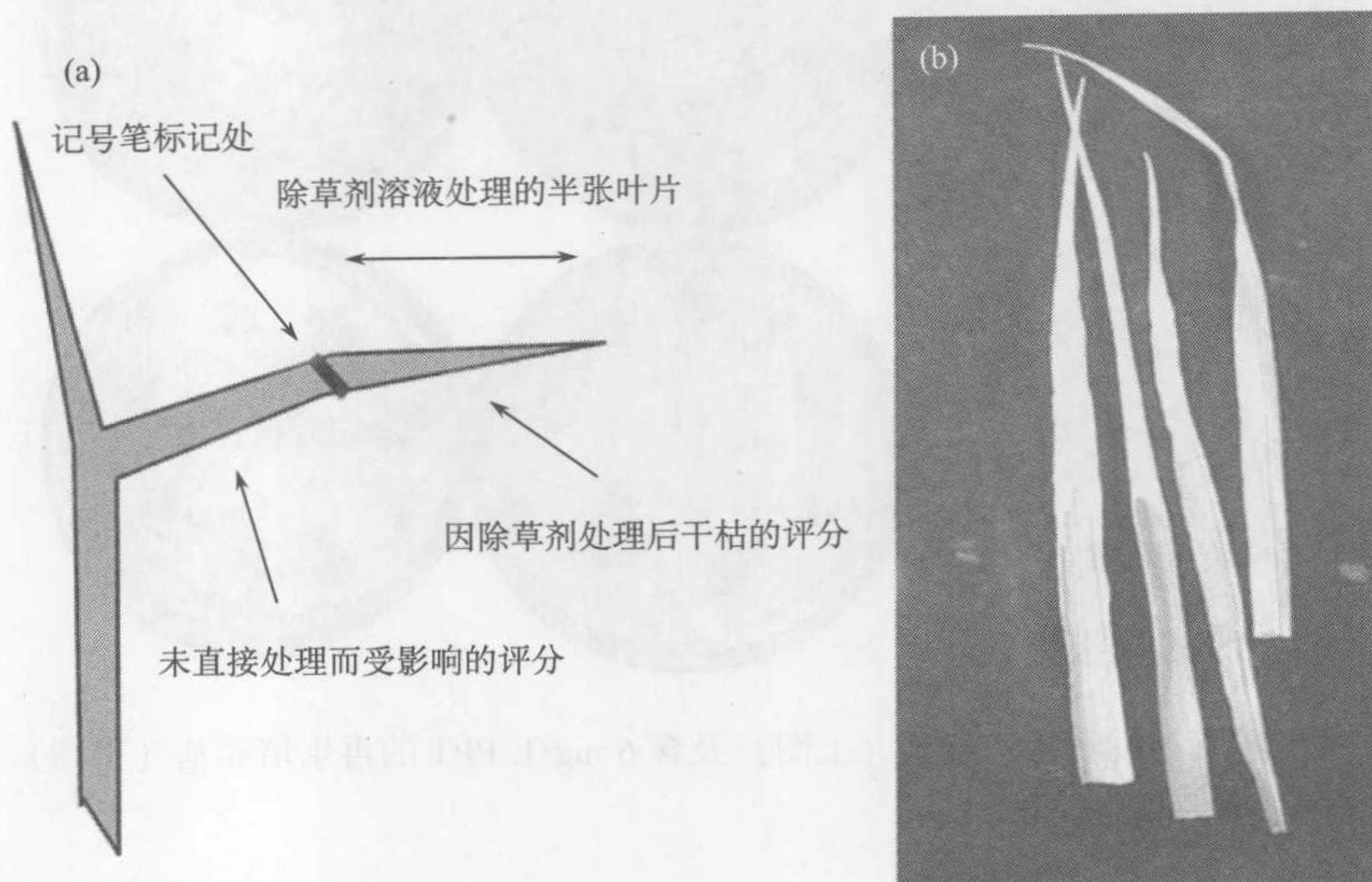


图 2.2　（a）除草剂叶片涂抹评分方法图释。（b）用 Challenge 除草剂（2.0 g/L PPT）涂抹叶片显示：与右边转基因抗性叶片相比，左边对照叶片远端区域出现干枯且白化

4. 注释

注 1：

· *bar*——具有 Basta 抗性，编码草铵膦乙酰转移酶（phosphinothricin acetyltransferase），分离自吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*）。

· *pat*——编码草铵膦乙酰转移酶，分离自产绿色链霉菌（*Streptomyces viridochromogenes*）。

· *cah*——编码氨氰合酶（cayanamide hydratase），分离自一种土壤真菌疣孢漆斑菌（*Myrothecium verrucaria*）。

· *hpt*（*hph*，*aph*-Ⅳ）——编码潮霉素磷酸转移酶，分离自大肠杆菌（*Escherichia coli*）。

· *epsps*——编码 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶（5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase，EPSPS），分离自农杆菌（*Agrobacterium*）CP4 菌株。

· gox——编码草甘膦氧化还原酶（glyphosate oxidoreductase），分离自苍白杆菌（*Ochrobactrum anthropi*）。

· *npt* Ⅱ——编码新霉素磷酸转移酶（neomycin phosphotransferase），分离自大肠杆菌（*Escherichia coli*）转座子 Tn5。

· *pmi*（*manA*）——编码磷酸甘露糖异构酶（phosphomannose isomerase），分离自大肠杆菌（*Escherichia coli*）。

· *lysC*—编码一种赖氨酸反馈钝感的天冬氨酸激酶Ⅲ（aspartate kinase-Ⅲ）（AK-Ⅲ），分离自大肠杆菌（*Escherichia coli*）。

· *codA*——编码一种胞嘧啶脱氨酶（cytosine deaminase），分离自大肠杆菌（*Escherichia coli*）。

注 2：许多作者将基于毒素的选择方法（如抗生素和除草剂）称为"负向选择"，将基于营养转换的方法（如蔗糖异构酶和选择性氨基酸）称为"正向选择"。然而，这种命名系统与其他研究领域的表述是矛盾的，尤其是在非植物研究的文献中，正向选择术语是指所有促进转化细胞存活的方式；负向选择术语指那些杀死转化细胞的方式。后者的定义似乎应用更为广泛。

注 3：在转基因试验中，来自不同链霉菌（*Streptomyces*）的两种编码草铵膦 *N*-乙酰转移酶的基因可产生 PPT 抗性。Basta 抗性基因（*bar*）分离自吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*），*pat* 基因分离自产绿色链霉菌（*Streptomyces viridochromogenes*）。

注 4：PPT 的 L 型异构体可以从各种商业品牌产品中购得，包括 Basta、Bialaphos、Ignite、Rely、Finale、Challenge、Liberty 和 Harvest 等。

注 5：更换品种或物种需要对培养基稍作调整，包括基本盐的选择（MS 或 L7）、糖源的类型（蔗糖或麦芽糖）及其浓度和/或激素的类型和含量。

注 6：已经构建的许多质粒含有 *bar* 基因或 *pat* 基因，这些广泛应用的质粒包括：

· pAHC20 和 pAHC25［59］整合了受玉米 *ubi*1 启动子、内含子及 *nos* 终止子调控的 *bar* 基因。

· pBARGUS［60］整合了受 CaMV 35S 启动子、*Adh*1 内含子和 *nos* 终止子调控的 *bar* 基因。

· pDBI［22］整合了受 CaMV 35S 启动子和 CaMV 35S 终止子调控的 *bar* 基因。

· pCB30 系列［61］为双元质粒，整合了受 *nos* 启动子和 *nos* 终止子调控的 *bar* 基因。

· pAL156 和其他 pGreen 系列为双元质粒，整合了受玉米 *Ubi*1 启动子、内含子和 *nos* 终止子调控的 *bar* 基因。

注 7：每个试验中应该包括各种对照培养皿：未经转化的空白对照，以检测供体组织的愈伤诱导及再生能力；空载体转化且不经选择，检测转化后的组织培养反应；经 DNA 转化和筛选的，检测选择过程对再生的影响。

注 8：所有溶液的配制都应使用经反渗透的去离子水，纯度为 18.2 MΩ/cm。应配制好各种培养基成分的无菌储存液；这些储存液在 4℃条件下可以保存 1~2 个月，若不进行冻融，在-20℃条件下至少可保存 1 年有效。

注 9：谷氨酰胺应先在 pH 9.0 条件下溶解，再与其他成分混合。

注 10：9%的蔗糖处理使细胞发生部分质壁分离，这样可以提高经受基因枪轰击的能力。然而，这因品种和物种而不同，例如，对于硬粒小麦盾片，通常 3%蔗糖处理更合适。

注 11：本章所述的用于农杆菌处理胚的诱导培养基成分，与用于基因枪转化的培养基成分有所不同，但如果为了方便，使用同样的诱导培养基也能取得相似的效果。

注 12：过滤灭菌用孔径 0.2 μm 的滤膜，大容量的用 MediaKap（NBS Biologicals Ltd.，Cambridgeshire，UK），小容量的用一种 Nalgene 注射过滤器（Fisher Scientific，UK）。

注 13：琼脂胶是一种凝胶剂，用于配制基因枪转化的胚诱导培养基和所有的再生培养基，植物凝胶用于配制农杆菌处理后胚的诱导培养基。两者都可以双倍浓度配制，121℃高压灭菌 20 min，然后可以直接使用，也可经微波炉重熔后再加入已过滤灭菌的双倍浓度培养基中。添加物在培养基倒入培养皿或 Magenta 培养盒之前加入。为了避免培养基凝固不均匀和重熔时的困难，琼脂胶和植物凝胶溶液在灭菌前后都应充分振荡。

注 14：草铵膦铵盐是草铵膦（PPT）与铵（Greyhound Chromatography and Allied Chemicals，Cheshire，UK）结合的合成产物，是除草剂 Basta 和 Challenege 等的活性成分。Bialaphos（phosphinothricylanalylanaline，sodium）（Melford Laboratories Ltd.）也是一种可供选用的有效选择剂，使用浓度为 3~5 mg/L。

注 15：各种抽提基因组 DNA 的试剂盒都已商业化。用 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒（Promega）可从 1~2 片 2 cm 长的叶片中提取 10~50 μg 的 DNA，足够用于 PCR 检测。然而，如果需要抽提大量 DNA，如 Southern 分析，就要用 CTAB（溴化十二烷基三甲基铵）法抽提［63］。

注 16：不同的除草剂其活性成分（PPT）的浓度不同，例如，Basta 为 200 g/L，Challenge 为 150 g/L。因此，需要依据先前计算所需的除草剂量，再来配制 0.2 g/L 和 2.0 g/L PPT 活性成分浓度的溶液。操作除草剂时应戴手套。

注 17：应在环境可控的室内进行培养，光照条件下室温设置为 22℃，由日光灯提供 12 h 光周期，其光照强度约为 250 μmol/(m^2 · s) PAR。在愈伤组织诱导培养期间，托盘用铝箔覆盖以保持黑暗。

注 18：一般情况下，在第二轮再生培养和随后的转移时进行选择处理。然而，选择可以提早进行，例如，在愈伤组织诱导或者第一轮再生培养时进行。提早选择可减少每个时期需要转移的愈伤组织及小苗数量，但是，如果一些转化细胞或植株不够强壮，不利的是，这些弱势生长个体在早期选择时会夭折。因此，如果需要早期选择，选择剂的浓度可以适当低一点。

注 19：选择剂浓度应设定为能够完全抑制非转基因外植体生长的浓度。但是，应该根据每个转移阶段培养物的生长发育进行浓度调整。一般来说，草铵膦铵盐（PPT）的浓度使用范围为 2~6 mg/L。

注 20：浓度为 2~6 mg/L 的毒莠定（Sigma-Aldrich）可作为一种备选的生长素来利用［64，65］。

注 21：$AgNO_3$ 加入诱导培养基可以促进胚性愈伤组织的产生，浓度为 10 mg/L 的 $Ag_2S_2O_3$（由 $AgNO_3$ 和 $Na_2S_2O_3$ 混合产生）可以作为一种替代用品。由于二者都对光照敏感，因此，存储液和任何含此类物质的培养基平皿都应该置于黑暗中保存。

注22：为了防止共培养后农杆菌的过度生长，应该在培养基中加入160 mg/L的特美汀［Ticarcillin/Clavulanic（15∶1），Melford Laboratories Ltd.］。

注23：体细胞胚性愈伤组织的诱导阶段一般需3~5周，然而，通常情况下应该定期检查外植体的污染情况。关注发育状况，利用判断能力和经验来决定转移到再生培养基的最佳时间。当胚性愈伤组织有了成熟的体细胞胚且一些刚好形成的小芽时，就可以进行转移。在这一阶段，应将整块愈伤组织转移，不要分开，每个培养皿约放置10块愈伤组织。

注24：与$AgNO_3$相似，$CuSO_4$是一种胁迫诱导剂用于促进长芽。最佳的$CuSO_4$浓度是100 μmol/L（25 mg/L），但是如果出芽太多，则浓度可改为50 μmol/L。

注25：每次继代培养时，应评估愈伤组织的芽、根形成情况，以观测在组织培养中的反应；一旦加了选择剂，则了解其选择的效果。

注26：玉米素仅需在第一轮再生培养过程中添加，而在第二轮再生培养阶段其作用并不重要。

注27：由于大多数胚性愈伤组织能够生长出芽和根，因此，重要的是要在选择培养基上完全抑制根的生长，这样可以降低非转基因植株混入的风险，避免产生非转基因植株。在这一阶段可用更深的培养皿，用另一个培养皿的底皿翻转过来当皿盖，这样可以使芽长得更高。

注28：再生培养阶段如果转移的愈伤组织大，可以减少9 cm培养皿中的愈伤组织块数。如果愈伤组织自然分开成几块，应当将每一块愈伤组织都做记录，以便追溯植株可能的来源。

注29：如果同一块愈伤组织产生了几株植株，应当做详细的记录，因为这些植株可能来源于同一个克隆。

注30：如果在这个阶段有许多绿苗存活，应该用更高浓度的选择剂PPT（6 mg/L）。

注31：由于组培苗的表皮蜡质很少或没有，因此，移栽到土壤后特别容易发生脱水。将新的盆栽转基因植株置于培养室中1~2周，保持高湿度环境以利蜡质层的形成。

注32：温室环境是白天18~20℃、晚上14~16℃，16 h的光周期，以自然光为主并以Son T 400W钠灯提供辅助光照，光照强度为400~1000 μmol/(m^2·s) PAR。

注33：叶片样品不要取自刚抽出的新叶，而应取已经舒展的叶片。

注34：在涂抹除草剂前，入选的植株要适当地浇水。

注35：涂抹除草剂应该十分严格，确保涂遍叶面并使部分溶液渗入叶片内。为了尽量减少除草剂由手套等传到其他叶片上，所有对照叶片应先涂抹低浓度的除草剂，然后再涂抹高浓度的除草剂。

致谢

洛桑研究所得到了英国生物技术与生物科学研究委员会（BBSRC）的资助。

（祁永斌　译）

参考文献

1. Fang, Y. D., Akula, C. and Altpeter, F. (2002) *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA : : barley genomic DNA junctions. *J. Plant Physiol.* 159, 1131-1138.

2. Murray, F., Brettell, R., Matthews, P., Bishop, D. and Jacobsen J. (2004) Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Reports* 22: 397-402

3. Jordan M. C. (2000). Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Reports* 19, 1069-1075.

4. McCormac, A. C., Wu, H. X., Bao, M. Z., Wang, Y. B., Xu, R. J., Elliott, M. C. and Chen, D. F. (1998) The use of visual marker genes as cell-specific reporters of Agrobacterium-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 99, 17-25.

5. Kaeppler, H. F., Menon, G. K., Skadsen, R. W., Nuutila, A. M. and Carlson, A. R. (2000) Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19, 661-666.

6. Ahlandsberg, S., Sathish, P., Sun, C. X. and Jansson, C. (1999) Green fluorescent protein as a reporter system in the trans formation of barley cultivars. *Physiologia Plantarum* 107, 194-200.

7. Harwood, W. A., Ross, S. M., Bulley, S. M., Travella, S., Busch, B., Harden, J. and Snape, J. W. (2002) Use of the firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. *Plant Cell Reports* 21, 320-326.

8. Huber, M., Hahn, R. and Hess, D. (2002) High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum aestivum* L. cv. 'Combi') by microbombardment of immature embryos followed by GFP screening combined with PPT selection. *Mol. Breeding* 10, 19-30.

9. Permingeat, H. R., Alvarez, M. L., Cervigni, G. D. L., Ravizzini, R. A. and Vallejos, R. H. (2003) Stable wheat transformation obtained without selectable markers. *Pl. Mol. Biol.* 52, 415-419.

10. Sparks, C. A. and Jones, H. D. (2004) Transformation of wheat by biolistics, in *Transgenic Crops of the World - Essential Protocols*, (Curtis, I. P., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 19-35.

11. Barcelo, P., Rasco-Gaunt, S., Thorpe, C. and Lazzeri, P. A. (2001) Transformation and gene expression, in *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology Vol.* 34, (Shewry, P. R., Lazzeri, P. A. and Edwards, K. J., eds.), pp. 59-126.

12. Goodwin, J., Pastori, G., Davey, M. and Jones, H. D. (2004) Selectable markers: antibiotic and herbicide resistance, in *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, (Pena, L. ed.), Humana Press, Totowa, NJ.

13. Pastori, G. M., Wilkinson, M. D., Steele, S. H., Sparks, C. A., Jones, H. D. and Parry, M. A. J. (2001) Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *J. Exp. Bot.* 52, 857-863.

14. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Cannell, M., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 52, 865-874.

15. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Lazzeri, P. and Barcelo, P. (1999) A facile method for screening for phosphinothricin (PPT) resistant transgenic wheats. *Mol. Breeding* 5, 255-262.

16. Jones, H. D., Doherty, A. and Wu, H. (2005) Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium-mediated transformation of wheat. Plant Methods* 1, 5.

17. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B. and Jones H. D. (2003) Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 21, 659-668.

18. Iser, M., Fettig, S., Scheyhing, F., Viertel, K. and Hess, D. (1999) Genotype-dependent stable genetic transformation in German spring wheat varieties selected for high regeneration potential. *J. Pl. Physiol.* 154, 509-516.

19. Weeks, J. T., Anderson, O. D. and Blechl, A. E. (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Pl. Physiol.* 102, 1077-1084.

20. Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E. and Vasil, I. K. (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio-Technol.* 10, 667-674.

21. Nehra, N. S., Chibbar, R. N., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C., Steinhauer, L., Baga, M. and Kartha, K. K. (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant J.* 5, 285-297.

22. Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994) Fertile transgenic wheat from micro-projectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5, 299-307.

23. Ortiz, J. P. A., Reggiardo, M. I., Ravizzini, R. A., Altabe, S. G., Cervigni, G. D. L., Spitteler, M. A., Morata, M. M., Elias, F. E. and Vallejos, R. H. (1996) Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep.* 15, 877-881.

24. Zhou, H., Arrowsmith, J. W., Fromm, M. E., Hironaka, C. M., Taylor, M. L., Rodriguez, D., Pajeau, M. E., Brown, S. M., Santino, C. G. and Fry, J. E. (1995) Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Rep.* 15, 159-163.

25. Weeks, J. T., Koshiyama, K. Y., Maier-Greiner, U., Schaeffner, T. and Anderson, O. D. (2000) Wheat transformation using cyanamide as a new selective agent. *Crop Sci.* 40, 1749-1754.

26. Pastori, G. M., Huttly, A., West, J., Sparks, C., Pieters, A., Luna, C. M., Jones, H. D. and Foyer, C. H. (2007) The maize Activator/Dissociation system is functional in hexaploid wheat through successive generations. *Funct. Pl. Biol.* 34, 835-843.

27. Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A. and Blanco, A. (2006) Phosphomannose iso merase, pmi, as a selectable marker gene for durum wheat transformation. *J. Cereal Sci.* 43, 31-37.

28. Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S. Z., Zhou, H. P., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. and Wan, Y. C. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115, 971-980.

29. Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F. and Fry, J. (2003) *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports* 21, 1010-1019.

30. Cheng, M., Hu, T. C., Layton, J., Liu, C. N. and Fry, J. E. (2003) Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 39, 595-604.

31. Mitic, N., Nikolic, R., Ninkovic, S., Miljus-Djukic, J. and Neskovic, M. (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration of *Triticum aestivum* L. *Biologia Plantarum* 48, 179-184.

32. Wu, H., Doherty, A. and Jones, H. D. (2007) Efficient and rapid *Agrobacteriummediated*

transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp durum) using additional virulence genes. *Transgen. Res.* In Press.

33. Khanna, H. K. and Daggard, G. E. (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep.* 21, 429-436.
34. Reed, J., Privalle, L., Powell, M. L., Meghji, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Wenck, A., Launis, K., Kramer, C., Chang, Y. F., Hansen, G. and Wright, M. (2001) Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 37, 127-132.
35. Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., Novitzky, R., Wang, H. and Artim-Moore, L. (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, pmi, as the selectable marker. *Plant Cell Rep.* 20, 429-436.
36. Funatsuki, H., Kuroda, H., Kihara, M., Lazzeri, P. A., Muller, E., Lorz, H. and Kishinami, I. (1995) Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 91, 707-712.
37. Nobre, J., Davey, M. R., Lazzeri, P. A. and Cannell, M. E. (2000) Transformation of barley scutellum protoplasts: regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 19, 1000-1005.
38. Brinch-Pedersen, H., Olsen, O., Knudsen, S. and Holm, P. B. (1999) An evaluation of feed-back insensitive aspartate kinase as a selectable marker for barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation. *Hereditas* 131, 239-245.
39. Wan, Y. C. and Lemaux, P. G. (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Pl. Physiol.* 104, 37-48.
40. Harwood, W. A., Ross, S. M., Cilento, P. and Snape, J. W. (2000) The effect of DNA/gold particle preparation technique and particle bombardment device on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111, 67-76.
41. Brinch-Pedersen, H., Galili, G., Knudsen, S. and Holm, P. B. (1996) Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feed-back-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Mol. Biol.* 32, 611-620.
42. Stiff, C. M., Kilian, A., Zhou, H. P., Kudrna, D. A. and Kleinhofs, A. (1995) Stable transformation of barley callus using biolistic? particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (*Bar*) gene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40, 243-248.
43. Jahne, A., Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor. Appl. Genet.* 89, 525-533.
44. Gurel, F., and Gozukirmizi, N. (2000) Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation. *Plant Cell Rep.* 19, 787-791.
45. Ritala, A., Aspegren, K., Kurten, U., Salmenkalliomarttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T. H. and Enari, T. M. (1994) Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol. Biol.* 24, 317-325.
46. Koprek, T., McElroy, D., Louwerse, J., Williams-Carrier, R. and Lemaux, P. G. (1999) Negative selection systems for transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.): comparison of bacterial codA- and cyto-

chrome P450 gene-mediated selection. *Plant J.* 19, 719-726.

47. Hagio, T., Hirabayashi, T., Machii, H. and Tomotsune, H. (1995) Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Rep.* 14, 329-334.
48. Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M. B., Thornton, S. and Brettell, R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11, 1369-1376.
49. Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W. and Harwood, W. A. (2005) A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* 23, 780-789.
50. Shrawat, A. K., Becker, D. and Lorz, H. (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.* 172, 281-290.
51. Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. and Loerz, H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotech. J. l* 4, 251-261.
52. Wang, M. B., Abbott, D. C., Upadhyaya, N. M., Jacobsen, J. V. and Waterhouse, P. M. (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. *Aust. J. Pl. Physiol.* 28, 149-156.
53. Torbert, K. A., Rines, H. W. and Somers, D. A. (1995) Use of paromomycin as a selective agent for oat transformation. *Plant Cell Rep.* 14, 635-640.
54. Torbert, K. A., Rines, H. W. and Somers, D. A. (1998) Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures. *Crop Sci.* 38, 226-231.
55. Somers, D. A., Rines, H. W., Gu, W., Kaeppler, H. F. and Bushnell, W. R. (1992) Fertile transgenic oat plants. *Bio-Technol.* 10, 1589-1594.
56. Maqbool, S. B., Zhong, H., El-Maghraby, Y., Ahmad, A., Chai, B., Wang, W., Sabzikar, R. and Sticklen, M. B. (2002) Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing hva1. *Theor. Appl. Genet.* 105, 201-208.
57. Zhang, S., Cho, M. J., Koprek, T., Yun, R., Bregitzer, P. and Lemaux, P. G. (1999) Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Rep.* 18, 959-966.
58. Cho, M. -J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. (1999) High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Sci.* 148, 9-17.
59. Christensen, A. H. and Quail, P. H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screen-able marker genes in monocotyledonous plants. *Transgen. Res.* 5, 213-218.
60. Fromm, M. E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J. and Klein, T. M. (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio-Technol.* 8, 833-839.
61. Xiang, C. B., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. and Oliver, D. J. (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 40, 711-717.
62. Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819-832.

63. Stacey, J. and Isaac, P. (1994) Isolation of DNA from plants, in *Methods in Molecular Biology - Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes Vol.* 28, (Isaac, P., ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 9-15.

64. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (1999) Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19, 118-127.

65. Barro, F., Cannell, M. E., Lazzeri, P. A. and Barcelo, P. (1998) The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theor. Appl. Genet.* 97, 684-695.

第3章　报告基因

Alison Huttly

摘　要：报告基因广泛运用于植物分子生物学研究，主要用以鉴别基因的表达模式，同时在获得稳定转化植株的过程中也可用作转化细胞的标记。理想的标记基因应该具备以下特性：操作简单、价格便宜、无毒性（toxicity）、稳定。最常用的报告基因如GUS、GFP、LUC及Cl+R/B［花青素积累（anthocyanin accumulation）］等多具有上述特性。当然，每一种报告基因主要的使用途径会有所不同，因此，在选择报告基因之前必须考虑实验的特殊性以及所用植物组织材料的要求。本章将介绍每一种报告基因，概述其使用方法，并讨论其优缺点。

关键词：报告基因，GUS，LUC，GFP，Cl+R/B，花青素积累

1. 前言

1.1　UidA（GUS）

20世纪80年代，R. A. Jefferson首先认识到大肠杆菌编码β-葡萄糖醛酸酶（EC. 3. 2. 1. 31）（GUS）的*UidA*基因可以用作植物定量检测的标记。市场上有各种β-葡萄糖醛酸试剂可供购买，它们水解后会产生有色或者带荧光的物质，且使用方便，加之植物内源性葡萄糖醛酸苷酶的活力水平较低，上述综合因素使得*GUS*基因被迅速而广泛地应用于包括禾谷类在内的多种植物［1,2］。

UidA酶单体分子质量约68 200Da，很可能以四聚体的形式发生催化作用。这种酶不需要辅助因子的参与，最适pH为5. 2~8. 0，耐受不同离子条件及去垢剂，因此在粗提物或者完整组织中检测十分简便。由于GUS对不同检测条件的耐受性和酶稳定性，其显著优点是易于进行定量分析。但是，反应底物不易透过细胞膜并与完整活体的GUS蛋白接触，所以不易测量完整活体组织的GUS活性或进行显色反应。当GUS作为报告基因用于基因表达研究时，这个缺陷影响不大；但是当GUS用作植物转化标记时，其应用就受到限制。尽管如此，现在至少有一种方法可以对植物组织的GUS活性进行非破坏性的原位检测［3］。

转基因材料GUS活性的检测主要有两种方法：利用产生荧光的底物，对植物提取物进行定量分析，或对整个组织进行组织化学检测。市场上有许多种荧光底物出售，其中4-甲基-伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸（MUG）为首选底物。MUG经GUS分解产生荧光物质4-甲基-伞形酮（MU）。

通过GUS基因表达进行细胞定位，不需要对GUS活性进行严格的定量分析，可以将5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-葡萄糖醛酸（X-Gluc）作为常用的组织化学底物。GUS酶催

化 X-Gluc 的分解反应，产生无色可溶的 5-溴-4-氯吲哚，进而氧化聚合形成不可溶的深蓝色靛青。X-Gluc 反应底物的重要优点是，产生的靛青易于肉眼观察，不需要专用设备。如果想近距离仔细观察组织，只需要一台低倍光学显微镜。GUS/X-Gluc 法的另一优点是组织经固定和包埋之后靛青依旧稳定，可以直接进行启动子表达模式的组织特异性鉴定。

1.2　萤光素酶（LUC）

萤火虫（*Photinus pyralis*）的萤光素酶（EC. 1. 13. 12. 7）基因（*LUC*）编码一个 62 kDa的蛋白质。整个酶促反应过程需要两个步骤：LUC 先与荧光素底物和 ATP 结合，产生一个酶复合物，然后经氧化脱羧反应，形成发光化合物氧化荧光素（OL），它能释放出 562 nm 波长的光子。

第一步：



$LH_2+MgATP+LUC \rightarrow LUC\text{-}LH_2\text{-}AMP+MgPPi$

第二步：



$LUC\text{-}LH_2\text{-}AMP+O_2+OH^- \rightarrow LUC\text{-}OL+CO_2+AMP+光+H_2O$

生物萤光（指生物体内的化学反应而产生的光）存在于多个物种中，所涉及的酶统称为萤光素酶。细菌 LUX 和珊瑚海肾（coral Renilla）RLUC 不同于萤火虫 LUC，主要是其催化的底物不同。虽然萤火虫 LUC 酶是已知的量子效率最高的一种萤光素酶，但若用于动植物研究，野生型 *LUC* 基因需要加以修饰，以获得光产量更高的萤光素酶［4,5］。

检测 LUC 可通过如下两种方法。一种是直接检测细胞提取物 LUC 酶的活性，可以采用照度计或者闪烁计数器检测。因为从酶复合物中释放氧化荧光素的过程缓慢，所以只有在高浓度 ATP 下，反应会产生一个起始的闪烁光（<10 s），随着酶活性的缓慢降低，光强衰减到较低水平的稳定状态，这样可能使荧光测量非常困难，因为从反应开始到检测发光必须要保持延迟时间一致并持续一段时间。庆幸的是，几种化学物质，如辅酶 A（CoA）和核苷类似物等，可以将发光产物起始的闪烁光转换为持续至少 1 min 的线性发光［6］。其可能的原理是增加了氧化荧光素及 LUC 酶的释放量。目前大多数 LUC 检测都使用这几种化合物。

另一种方法是对 LUC 酶活性进行活体测量，但这需要使用高灵敏度电耦合（CCD）成像系统。在中性 pH 条件下荧光素带负电，因此推测荧光素是不可透过膜的，但实际并非如此。通常情况下，仅仅用荧光素溶液喷洒植物，就足够可以渗透到细胞膜内［7］。植物中 CoA 的含量低，喷洒荧光素之后，积累的 LUC 会产生荧光猝发，类似于在没有 CoA 存在时组织提取物与荧光素之间发生的反应。LUC 蛋白相当稳定，但经过仅仅几个酶反应循环后，它便会丧失催化活性。因此重复喷洒荧光素数次之后，光的产生变得依赖于 LUC 酶的重新生物合成。从这一点来说，荧光产量反映了处于稳态的酶合成产量。LUC 报告系统的这一特性被有效应用于研究基因表达的实时变化，例如，可用于帮助我们理解动植物的昼夜节律调控网络［8,9］。

即使使用强的组成型启动子，*LUC* 基因转化植物产生的荧光亮度也非常低，需要

异常灵敏的仪器在完全黑暗的条件下检测。也许正因为LUC的检测需要使用特殊仪器，所以除了将LUC应用于研究基因表达的动态变化之外，研究者似乎不喜欢把LUC用于植物的报告基因，而更青睐于用GUS或者GFP。此外，LUC与GUS作为双元报告系统的组成部分，常被用于基因的瞬时表达（transient expression）分析［10］。

与荧光蛋白相比，生物萤光素发出的光非常弱，需要长的曝光时间，但长时间曝光会导致时空分辨率降低，所以在进行瞬时反应及亚细胞水平成像时，用荧光蛋白作为报告基因可能更合适。但是，植物材料中生物萤光素的背景水平非常低，LUC的信噪比通常低于荧光蛋白。LUC的另一个优点是生物荧光反应不需要借助外来光源，报告基因产生的光不会发生光漂白，同时组织也不会遭受短波长光源的损伤。基于上述原因，以LUC作为光子供体的生物荧光素共振能量转移（bioluminescence resonance energy transfer，BRET）技术在蛋白质互作研究中逐渐被广泛应用［11］。

在禾谷类作物中，LUC的主要应用局限于基因的瞬时表达研究，以及大麦、小麦转化实验中，作为稳定转化细胞和再生植株的标记基因［12,13］；转LUC植株的活体荧光图像采集只在水稻转化研究中有所报道［14］。

1.3　GFP、GFP变体及其他荧光蛋白

绿色荧光蛋白（GFP）来源于水母（*Aequorea victoria*），是一个分子质量27 kDa、性质稳定的荧光蛋白。荧光是一种光学现象：一个分子吸收一个光子跃迁到激发态，在返回基态时发出另一个光子，因为在这两个事件之间分子振动或者热量吸收会造成一部分能量丢失，所以发出的光子能量变低而波长变长。吸收光谱与发射光谱之间的差异，即斯托克斯位移（Stokes shift），直接取决于发色团的结构。野生型GFP在395 nm和475 nm处有两个吸收峰，它们对应于发色团的质子化状态和去质子化状态；而在503 nm和508 nm处，有相应的两个发射峰。GFP荧光的产生只需要O_2，而不需要其他外界底物或辅助因子，因为这种荧光来源于GFP内部的*p*-羟苯基-咪唑发色团。该发色团由GFP第65~67处的丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸序列经环化、氧化而产生。因此在活体中检测GFP只需要蓝色光源，并对绿光进行检测，这就使GFP成为监测活体内基因表达、蛋白质互作的理想选择［15］。

然而，最初使用野生型GFP的实验结果并不理想，因为即使使用强组成型启动子，在异源宿主转化细胞中荧光仍极其微弱，甚至观察不到荧光。值得庆幸的是，许多实验室致力于改造野生型GFP，获得了亮度更强、光谱特性更优的GFP。这些新的GFP变体，成功地作为报告基因广泛地应用于植物和其他生物的研究［16，17］。

将GFP的一些氨基酸产生诱变，如203位苏氨酸突变，产生出最大吸收峰值为514 nm、发射峰值为527 nm的GFP变体，使发射峰位移到可见光谱的红色区域，产生黄色荧光蛋白（YFP）。而其他的突变产生GFP的蓝色变体（BFP）和青色变体（CFP）。起初，获得这些不同光谱形式的荧光蛋白（FP）会损失一些特性，如亮度、pH敏感性或者稳定性。但是通过改进，现在已经获得了全光谱型的各种GFP变体［16］。

实际上，水母只是能够产生荧光蛋白的许多物种中的一种。目前，从这些物种分离

出几个荧光蛋白基因，如来源于珊瑚（*Discosoma* sp.）的具有红色发射峰的红色荧光蛋白（DsRed）[16]。

任意一种荧光蛋白的检测，必须要配备一台适宜的荧光显微镜（fluorescent microscopy）。根据吸收光谱和发射光谱的特征，荧光显微镜可以捕捉单分子光的分布图像。实现这一性能需要强光源照射，如广视野荧光显微镜或落射荧光显微镜（epi-fluorescent microscopy）需使用汞灯、氙灯，共聚焦显微镜需使用激光；另外还需要合适的滤光片，以及在暗视野下捕捉图像的灵敏方法。落射荧光显微镜足以观察各种实验材料，但是对那些比较厚的样品，就需要使用共聚焦显微镜。

通过精选荧光蛋白变体和合适的滤光片，并配以软件分析荧光信号，可以从一个植物细胞中检测到多达 4 种不同的荧光蛋白。不管有无额外的氨基酸接头，荧光蛋白对 N 端和 C 端的蛋白融合都表现耐受性，所以在蛋白质的亚细胞定位及蛋白质互作研究中，荧光蛋白非常有用。荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）、荧光漂白恢复（fluorescence recovery after photobleaching，FRAP）、荧光寿命成像（fluorescence lifetime imaging，FLIM）、双分子荧光互补（bimolecular fluorescent complementation，BiFC）等技术，正逐步地成功应用于禾谷类作物等植物的研究中［18，19］。在植物中，遗传编码产生的 Ca^{2+} 指示蛋白与荧光共振能量转移法结合运用尚不普遍，但已有成功的报道［19］。

此外，荧光蛋白作为报告基因，在获得稳定转化的试验中，尤其是对于禾谷类作物的转化，既可作为筛选的方法之一，也有助于提高转化效率［20~23］。

虽然一般不需要对提取物中的荧光蛋白进行定量分析，但是需要的话，可以用分光荧光计测定，并与已知纯化荧光蛋白的荧光量相比较，得出 FP 的含量［24］。

1.4 C1+R/B：花青素积累

花青素（anthocyanin）是水溶性的黄酮类色素，可在液泡中高水平积累。通常存在于许多高等植物器官的外层细胞，最明显的部位是在花朵和果实上，所以，花青素的名称“anthos”代表花，“kyanos”代表青色。事实上，花青素的颜色可在红色到蓝色之间变化，表现何种颜色由其化学结构、pH 及浓度所决定。花青素只是多种芳香族黄酮类家族中的一个亚类，由苯基丙酸代谢途径合成。该途径的其他分支合成无色的抑素、黄酮、黄酮醇、黄烷双醇、橙酮、异黄酮类，以及褐色素氧化生成的原花青素（缩合单宁）、鞣红［25，26］。在每一亚类中，通过对基本芳环结构的各种取代反应，不同的植物和组织产生一系列衍生物。

花青素为植物授粉和种子传播提供了视觉上的引导，也可以起到抵御环境胁迫和防护紫外辐射的作用。例如，在极端的温度、水分和光照胁迫下，植物会自然积累花青素。与花青素代谢相关的多数组成性酶存在于细胞质中，它们可能是多酶复合物的一部分，其最终产物都被转运至液泡中储藏，所以，这些物质的合成也与细胞的形态发生、液泡的形成及其生理机能相关［26~29］。

花青素的颜色具有较强的细胞自主性，不需要加另外的发光底物，与发育无关，无毒。所以，花青素积累一直以来被认为是一种有用的报告系统，既可用于转基因瞬时表

达研究，也可用于筛选稳定的转化体。倘若合成花青素代谢途径中某一个酶基因发生突变，结果植物产生花青素缺陷的突变体。通过转化手段将丢失的基因重新转入到这一植物中［30］，便形成最容易检测的报告系统。但是，这必须先有足够的一系列花青素酶基因缺陷的突变体，这一因素限制了这种技术的应用。相反，若对野生型花青素合成途径的调控基因进行遗传操作，可以提高花青素的积累。因为，尽管在花青素合成过程中涉及多个酶催化步骤，但其合成途径的调控依赖于极少数的调控基因。例如，玉米花青素的调控主要涉及两类转录因子——bHLH 和 MYB 的成员［29］。细胞内花青素的合成，需要细胞核中 MYB 和 bHLH 两类转录因子的共同表达，因为这两种转录因子通过形成一个异源二聚体，促进组成性酶基因的转录。玉米具有这两类转录因子的一个同源基因家族，其各个基因参与不同部位花青素的合成。在胚和胚乳的糊粉层中，MYB 家族的 *C*1 基因负责花青素的积累，而在其他部位，花青素积累与 MYB 家族的 *PL* 基因密切相关［31］。在玉米基因组的 R 基因座和 B 基因座中，*bHLH* 基因发生了多次的重复和特化的进化过程［32］。

但是，已有的研究表明同源基因在功能上是冗余的，如一个基因的过表达能够代替另一不同组织中缺乏的同源基因。此外，玉米的花青素调控蛋白能够激活异源宿主拟南芥和烟草中花青素的合成［33~35］，这表明物种间黄酮类合成途径中的成分及其调控过程是保守的。进一步研究表明，整个苯基丙酸合成途径的调控可能还有其他不同的转录因子参与。但要影响花青素的积累，一般只需要过表达主要的 MYB 和 bHLH 转录因子就可以实现［36］。在某些情况下，只需过表达 MYB 或 bHLH 因子之一就可以产生花青素。在另一些情况下，这两种因子都需要被过表达。这大致反映出细胞中内源性 MYB 或 bHLH 转录因子的水平，以及特定组合的宿主因子与导入因子间能否正确地相互作用。

虽然，并不是所有类型的细胞过表达 MYB/bHLH 转录因子都可产生花青素积累，但是这一现象确实可以在发育的特定阶段实现。例如，禾谷类中，花青素可以在胚乳外层即糊粉层中自然积累，但是在水稻或小麦发育的籽粒中，即使使用强组成型启动子 C1+R-S 或 C1+R-Lc 的过表达，也不能在内层含淀粉的胚乳细胞积累花青素［37，Huttly 未发表数据］。在水稻胚乳细胞中，检测到其他无色的黄酮类物质，同时检测到苯基丙酸合成路径中至少某些组成型基因的表达有所增强，这表明只是该途径的一部分被激活［37］。有几种原因可以解释为什么没有花青素产生：代谢物通过苯基丙酸路径的其他分支流失，或者细胞或液泡所处的分化状态不同。这样，当尝试研究组织特异性启动子时，以花青素积累为报告系统就受到很大的限制。因为在个别细胞类型中，有色素沉积的缺失可能并不是启动子失活的原因。尽管如此，花青素积累已经被用作可视的转化标记，以改进禾谷类转化的方法和标记转基因植物［38~40］。暗红色的转基因植物在商业应用上并不受欢迎，这使得这项技术的推广应用受到限制，仅限于用作项目研究。在基因的瞬时表达分析中，已证实花青素积累是最有用的，因为单个阳性转化细胞数是很容易统计的［41］。花青素积累既可以作为一种参考，也可与 GUS、LUC 或 GFP 等任何一种报告基因共同组成报告系统。

2. 材料

2.1　载体构建

（1）*UidA*：许多带 *UidA* 基因的载体可向有关公司购买，或从使用者的实验室获赠（见注 1）。最近，从葡萄球菌和青霉菌中分离得到的含有葡萄糖醛酸酶基因的载体，分别命名为 GUSPlus 和 penGUS。据报道，它们在植物中的活性比 GUS 高十倍多［42］。

（2）*LUC*：据报道，Promega 公司通过去掉隐蔽的剪切位点、糖基化位点、poly A 位点，并改进了密码子［4］，其提供的 *LUC*⁺基因在小麦和玉米中的产光活性比野生型 LUC 高出 50 多倍［5］。在该酶基础上，对将 LUC 蛋白导入过氧化物酶体的 C 端序列也进行了修饰，以阻止其进入此细胞器。现已证实 *LUC*⁺基因可以进行 N 端和 C 端的蛋白融合［4，11］。

（3）荧光蛋白：Clontech 公司和获得荧光蛋白变体的实验室可以提供各种荧光蛋白基因［16，17］，这其中包括用于细胞核、内质网、质膜等亚细胞定位的荧光蛋白［18，19］。在禾谷类中测验发现，荧光蛋白主要局限于大麦和小麦的 sGFP S65T［20，21］，或是水稻的 mGFP5-er［43］。这些突变体包含以下的修饰：改进密码子的使用，去掉隐蔽性的内含子以优化基因表达，改变氨基酸以提高蛋白成熟速率、光子产量及光稳定性。所有这些修饰都使荧光蛋白受体的亮度在野生型荧光蛋白的基础上有所增加［16，17］。

EYFP、mCitrineYFP、ECFP、mRFP 这些荧光蛋白也已经成功地应用于植物研究［18，19］，而且有报道称源自迎风海葵属（*Anemonia*）、香菇珊瑚（*Discosoma*）、花群海葵属（*Zoanthus*）的 5 个珊瑚礁荧光蛋白也被应用于包括禾谷类在内的许多植物中（见注 2）。

荧光蛋白的选择使用很大程度上取决于实验类型，以及所要研究的特定植物或组织。关于现有荧光蛋白的物理特性及其吸收、发射光谱，相关综述文献提供了有用的信息［16，18］（见注 3）。

（4）花青素调控基因：在转基因植物中被用于调控花青素合成量最常见的基因是玉米 *MYB C1* 基因与玉米 *R-Lc* 基因，或者是由一系列不同的启动子驱动其表达的 *B-peru bHLH* 基因［35，38，45，46］。可以从报道克隆和使用的实验室获得这些基因。若在一个新的体系中将花青素积累作为标记，必须同时超表达两种类型的转录因子，或者检测其中的一种转录因子能否满足花青素调控的需要。

2.2　培养基

2.2.1　通过 MUG 检测 GUS 荧光

（1）GUS 缓冲液：50 mmol/L Na_3PO_4 缓冲液，pH7.0；10 mmol/L EDTA-Na_2；0.1% TritonX-100；0.1% 十二烷基肌氨酸钠；10 mmol/L DTT（见注 4）

（2）3 M：0.4 mol/L 甘露醇，15 mmol/L $MgCl_2$，0.1% MES，pH5.4

（3）0.2 mol/L Na_2CO_3（无水）

2.2.2 组织化学法检测 GUS

HGUS 缓冲液：100 mmol/L Na_3PO_4 缓冲液，pH7.0；10 mmol/L EDTA；0.1% TritonX-100。

使用前加入：

（1）1 mmol/L（0.5 mg/ml）X-Gluc 三水钠盐（相对分子质量：489.7）（储存液：10 mg/ml 溶于水，-20℃避光保存）

（2）1 mmol/L 铁氰化钾，1 mmol/L 亚铁氰化钾（见注 5）

（3）10 μg/ml 氯霉素（储存液：10 mg/ml 溶于乙醇），4 μg/ml 利霉菌素（nystatin）（储存液：4 mg/ml 溶于乙醇）（见注 6）

（4）10~100 mmol/L 抗坏血酸盐（见注 7）

2.2.3 LUC 分析

（1）萤光素酶裂解液：100 mmol/L K_3PO_4 缓冲液，pH7.8；1 mmol/L EDTA；10% 甘油；1 % TritonX-100，7 mmol/L β-巯基乙醇

（2）3 M：0.4 mol/L 甘露醇，20 mmol/L $MgCl_2$，0.1% MES，pH5.4

（3）萤光素酶检测缓冲液：20 mmol/L 麦黄酮（Tricine），pH7.8；5 mmol/L $MgCl_2$；0.1 mmol/L EDTA；3.3 mmol/L DTT；270 μmol/L 辅酶 A；500 μmol/L 荧光素；500 μmol/L ATP（小份分装，-70℃保存）（见注 8 和注 9）。

3. 方法

3.1 利用 MUG 检测 β-葡萄糖醛酸酶（GUS）

GUS 分解 MUG 生成荧光产物 MU，但 MU 的荧光只有在它的羟基离子化时才最亮，因此必须把 pH 调至 8 以上，同时也有利于反应的终止。之后，MU 产物能够在荧光计中检测，并参照已知的 MU 标准物或者由纯化的 GUS 蛋白绘制的标准曲线进行定量分析。尽管试卤灵葡萄糖醛酸（resorufin glucuronide）的激发波长为 570 nm，发射波长为 590 nm，中性 pH 下荧光最强，可以作为一种有效的 MUG 替代物，也可以选购许多其他的荧光底物，但这些并不常用。其他底物替代品的使用方法可以参照［47］。

3.1.1 完整组织的提取

（1）取少量（5~50 mg）叶片、根、愈伤等组织样品，所需样品量由材料决定（见注 10）。

（2）离心管中加入 GUS 缓冲液（50~200 μl），组织匀浆。

（3）16 000 *g*，4℃离心 15 min，沉淀破碎的细胞。

（4）检测提取物的蛋白质浓度（见注 11）。

（5）用 GUS 缓冲液稀释提取物，使蛋白质总浓度为 0.1 mg/ml。

（6）立即使用提取物，或者-80℃保存（见注 12）。

3.1.2　原生质体制备

（1）通过离心（50 *g*，1 min），小份（1×10^6）收集转化的原生质体，用 2 ml 的 3 M缓冲液重悬（见注 13）。

（2）取一份原生质体，用血细胞计数板计数。

（3）将剩余的原生质体 50 *g* 离心 1 min，用 150 μl 的 GUS 缓冲液重悬，短暂涡旋（或者通过 26G 的抽吸），静置 5 min。

（4）离心（16 000 *g*，4℃ 15 min），使细胞碎片沉淀。检测提取物的蛋白质浓度，参照完整组织样品的方法（第 5 步）对其进行稀释。

3.2　MUG 荧光分析

（1）分别取 25 μl 和 50 μl 组织提取物样品于 96 孔板中（黑色或者白色），包括未转化的对照组织，加 GUS 缓冲液至总体积为 200 μl，混匀。

（2）加入 100 μl 含 2.5 mg/ml MUG（终浓度为 2 mmol/L）的 GUS 缓冲液以开始反应，混匀，加盖。

（3）37℃温浴，反应 5~10 min。取 50 μl 反应液加入另一个含有 200 μl 0.2 mol/L Na_2CO_3 的微型板中，以终止反应。然后按照合适的时间间隔（10 min、20 min、30 min 或者 1 h），再取 50 μl，进行相同的操作。

（4）在 365 nm 的激发光、455 nm 的发射光下，用数显荧光计测量 MU 产物的荧光量。检测样品产生的线性动力学关系，蛋白提取物稀释值及重复测量的荧光量是否相对应（见注 14 和注 15）。

（5）GUS 活性可以用 pmolMU/min/mg 蛋白来表示。其中 MU 标准物按照荧光读数器线性关系的浓度（如 0~5 μmol/L），通过 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液稀释，并置于板上。1 mmol/L 的 MU 甘油溶液应 4℃保存，使用前检测有无 Na_2CO_3 的沉淀。

或者，荧光活性也可以用荧光单位（flu）/ng 蛋白/min 表示。要把这个值转化为 UidA 蛋白的量，需要用纯化的 GUS 酶（*E. coli* VII-A，Sigma）绘制标准曲线：用 GUS 缓冲液稀释 GUS 酶至 0.1 ng/μl 的工作浓度，在总体积为 50 μl 的 GUS 缓冲液中加入 0~2 ng 的 GUS 酶，按照上面的步骤进行分析。

（6）有些植物组织含有高水平的内源性 GUS 活性，但可以优化反应条件来检测这些组织的 GUS 活性（见注 16）。

3.3　GUS 活性的组织化学检测

关于以 5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-葡萄糖醛酸（X-Gluc）为底物检测 GUS 的组织化学方法，文献中有多个略有差异的版本［47］。它们的主要不同在于对 X-Gulc 反应中两个潜在问题的处理上。第一是底物葡萄糖醛酸的膜不透性，或组织穿透的问题；第二，无色中间物 5-溴-4-氯吲哚的可溶性，使它可能从 GUS 酶活性位点处扩散出去。这两个方

面都会影响靛青产物关于酶活性组织和细胞定位的精确性。对于任何一种新的转基因材料，必须观察预固定及添加铁和亚铁氰化物的效果。添加这些物质，可以催化5-溴-4-氯吲哚的氧化作用。同时要分析未转化的组织，以估计内源性GUS酶的活性，其重要性在于有些组织尤其是花粉中的GUS酶水平非常低，正在发育的种子和水果中的GUS酶水平却可能非常高［48］。关于减少或者去除内源性GUS酶活性的方法，许多文献都有介绍（［49］，见注16）。

针对使用X-Gulc存在的一些问题，开发了GUS的其他替代底物。苏丹-β-D-葡萄糖醛酸分解成β-葡萄糖醛酸，并产生不溶性的苏丹红，这样就不会出现扩散导致的误差。试验结果表明，最新的苏丹红Ⅳ变体可能是一种有价值的葡萄糖醛酸的组织化学替代物［50］。同样，人们还开发出β-葡萄糖醛酸苷酶的荧光底物，其膜透性相对好一些。ImaGene Green C_{12}FDGLcU 产生的5-十二酰氨基荧光素（吸收波长495 nm，发射波长518 nm）可以保留在细胞里，一些文献已经报道了这种底物的使用，但是还没有普及运用［2，51］。

图3.1（a）为利用基本的组织化学法检测拟南芥稳定转化植株叶组织的结果。该植株经由启动子和*GUS*基因融合的载体所转化。材料没有提前固定，但是缓冲液里添加了1 mmol/L的氰化铁和氰化亚铁盐。该图片通过莱卡MZ8型立体显微镜上莱卡DFC300FX型数码相机拍摄。

（1）将组织置于（见注17）新配制的HGUS缓冲液中（含有X-Gulc及其他添加物），足以完全浸没材料。试验在微量滴定板或者试管中进行。

（2）吸真空5~10 min，然后去掉真空条件（见注18）。

（3）铝箔包裹，37℃放置48 h（见注19）。

（4）用100 mmol/L的磷酸盐缓冲液（pH为7.0）洗脱材料。

（5）为了清洗材料以便观察，在25%的乙醇溶液中孵育15~30 min（见注20），在50%的乙醇溶液中孵育15~30 min，在75%的乙醇溶液中孵育30 min。

（6）最后，在90%的乙醇溶液中（期间更换几次）37℃孵育2~4 h，或者直到所有的叶绿素去掉为止（见注21）。

（7）样品可以无期限地保存在90%的乙醇溶液中。盖紧盖子，避光室温放置，但要经常监测乙醇的含量。

3.4 植物提取物中LUC活性的检测

LUC催化的反应取决于几个不同的参数，包括温度、pH、化合物浓度及金属离子。基于这个原因，标准的检测方法使用已知体积的麦黄酮缓冲液，pH为7.8，内含Mg^{2+}、DTT及EDTA。操作在室温下进行。

3.4.1 完整组织

（1）液氮速冻植物组织（5~50 mg），研磨成粉末状。

（2）100~400 μl裂解液室温重悬，组织匀浆。

（3）16 000 *g*，4℃离心15 min，弃掉破碎的细胞。

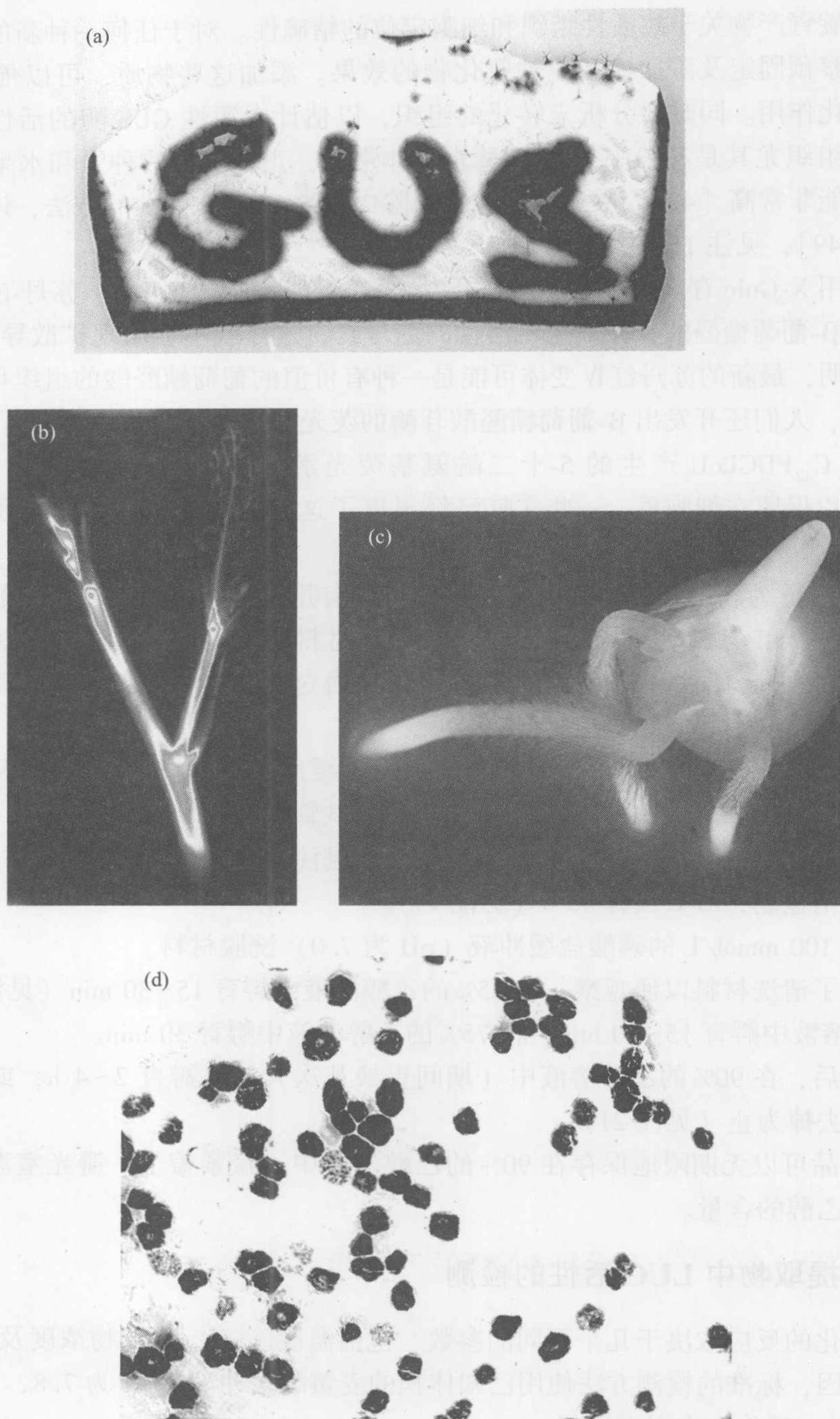


图 3.1　(a) 拟南芥稳定转化植株叶片 GUS 活性的组织化学检测，其 GUS 活性由一个甘蓝型油菜高表达活性基因的启动子控制。(b) 同一启动子控制的 *LUC* 基因在拟南芥茎、茎生叶及正在发育花芽上部表达的活体检测。(c) 水稻 actin 启动子控制的 sGFP *S65T* 基因在小麦萌发的种子中的表达。(d) 花青素在发育的小麦糊粉细胞中的瞬时积累，基因枪轰击后，小麦 8S 球蛋白启动子驱动玉米 *R-Lc* 和 *C1* 基因的表达（见图版）

（4）检测提取物中的蛋白质浓度（见注 22）。

（5）立即使用提取物，或者-80℃保存。

3.4.2　原生质体

（1）50 *g* 离心 4 min，小份收集（1×10^6）原生质体。

（2）用 2 ml 的 3 M 缓冲液重悬，50 *g* 离心 4 min。

（3）400 μl 裂解液重悬，短暂涡旋（或者通过 26G 的抽吸）。

（4）16 000 *g*，4℃离心 15 min，沉淀破碎的细胞。检测提取物的蛋白质浓度。

3.4.3　萤光素酶的检测

有许多种不同的光度计可供使用，最精细也是最昂贵的光度计是基于 96 孔板设计，可全自动化操作。以下是数显光度计的使用方法（见注 23）。不同的仪器敏感度和信噪比不同，但是最低可以检测到 1 fg 的萤光素酶。对于每一种仪器，一定要确定光检测的线性范围并绘制标准曲线。此外，使用液体闪烁计数器也可以检测生物荧光素（见注 24）。

（1）取 20 μl 分装的组织提取液于不透明的微型板，以未转化组织的提取物作对照。

（2）设置光度计程序，加入 100 μl 萤光素酶分析缓冲液（见注 25），等待 2 s，在 10 s 内读出萤光素酶的活性值。反应的光强度接近常数的时间约为 1 min，然后慢慢衰减，半衰期大约 10 min。如果光是充足的，读数时间也会缩短。

（3）用荧光单位 flu/10 s/mg 表示活性，或者参照提纯的 LUC（用来制作标准曲线）的表示方法（见注 26）。

（4）经常会使用第二种报告基因（内参对照）如 GUS 进行瞬时表达分析，其检测结果再与对照报告基因的表达对比和进行标准化。需要注意的是，有报道说当植物组织用萤光素酶裂解液提取后，GUS 会被完全激活，但是 GUS 缓冲液会影响到 LUC 的活性。第二点需要说明的是，对照载体既不会影响被检测载体的表达，也不会受到培养条件的影响。一般而言，在基因枪转化或者电激转化前，通过以 1∶10 的比例混合对照载体与被检测载体，使得对照载体的表达量保持在较低水平。另外要知道瞬时表达实验需要多次重复，以对数据的统计相关性进行分析。

3.5　利用冷型 CCD 像机进行 LUC 的活体检测

对于萤光素酶的检测来说，需要解决荧光素渗透进入活体组织这一问题［7］。多数情况下，用荧光素溶液简单地喷洒植物就可以解决，但是一些组织，如发育后期的种子不能吸收荧光素，需要产生伤口（见注 27）以利于底物进入［52，53］。通过组织提取或者原位杂交的方法，植物中 LUC 活性的明显缺失应该很容易得到确定［7，54］。因为伤口会影响荧光素-O_2 的动态平衡，即使是重复喷洒荧光素之后达到了平衡，也难于利用 LUC 来研究受创伤影响的基因表达。

尽管 O_2 和 Mg^{2+} 一般不会限制萤光素酶的活性，但是在特殊情况下，如植物组织被淹没时，O_2 含量会成为限制因素，随之导致产光量的降低［7］。生长在不同氧合水平

下的细胞悬浮培养物被检测到不同水平的 LUC 活性。

3.5.1 材料的准备

（1）用喷雾器将 1~5 mmol/L 的 D-萤光素水溶液直接喷洒到整个植株上，使其完全湿润（见注 27）。100 mmol/L 的 D-萤光素水溶液小份分装，-20℃保存，用前进行稀释。

（2）在图像采集前的 24 h、16 h、4 h、2 h，重复上述的萤光素喷洒实验。

3.5.2 LUC 的活体检测

捕捉低强度发射光最简单的方法是通过 X 射线或感光胶片。将表达萤光素酶基因的整个植株压在 X 射线胶片上，就可以获得该植株的照片，尽管这种图片的分辨率不高，但是它显示了基因表达的位置。因此，对于大多数实验来说，必须要购买一台敏感性的 CCD 成像系统。常用的 CCD 系统有两种类型：慢速扫描液氮制冷 CCD 成像系统和增强 CCD 成像系统。制冷 CCD 系统一般可以提供更高的时空分辨率［9］，但它对超过 500 nm 的波长有更高的敏感性（见注 29）。其中的一种成像系统是利用硅晶片，它能在受到光子轰击后发射出电子。一个单独的像素发出的电子通过电子方法进行定量，从而产生图像。发出的电子数以灰度等级单位（gsu）表示。像 MetaMorph 这样的软件，能够将这些 gsu 值转换为边界值范围内的伪彩色图像，所以可以对设定区域的荧光水平进行定量。但实际上，很难得到整个植株的图像，因为叶片以及其他器官的方向也会影响检测的信号。图 3.1（b）显示的是启动子-LUC 拟南芥转化植株茎、茎生叶、正在发育的花芽上部的表达情况。该照片是用 Princeton Instruments 公司生产的慢速扫描液氮制冷 CCD 成像系统配以尼康 50 mm 的镜头拍摄，曝光时间 3 min。它是一个伪彩色图像，由 MetaMorph 软件制作，蓝色代表低强度像素，红色代表高强度像素。

（1）液氮冷却相机，达到-120℃的工作温度（见注 30）。

（2）在捕捉图像前的 10~20 min，用萤光素喷洒材料。

（3）将植株或者离体的叶片、茎、根放在载物台上，开启后灯，对焦，根据说明捕捉图像。

（4）关灯，将材料置于完全黑暗中 5~10 min（见注 31）。

（5）在 1~30 min 捕捉图像（见注 32）。

（6）利用图像软件计算图像的光强度（见注 33）。

3.6 荧光蛋白（FP）的显微检测

表达荧光蛋白的材料一般首先用落射荧光显微镜（epi-fluorescent microscopy）来观察，尤其当研究表皮上表达的荧光蛋白或者用反褶积软件去掉从焦点之外采集的荧光时［18］。然而，对于较厚的材料，必须使用共聚焦显微镜，因为它可以穿过产生荧光的样品，深入材料 50 μm 或更厚的地方，从而产生很薄的（0.5~1.5 μm）光切片。此外，如果对多种荧光蛋白成像，共聚焦显微镜也十分有用，它可以同时检测多种发射波长（参见注释 34）。共聚焦显微镜的主要缺点是使用激光照射样品。因为通常可用的激

光激发波长范围有限，所以激发波长必然会与激发效率相冲突，而激发效率取决于发色团的物理特性，虽然只需要25%的激发效率，但是80%或者更高的效率更合适。

正确选择滤光片非常重要（见注35），不管使用哪种显微镜，次优的滤光片都会导致所观察到的荧光蛋白亮度明显降低；相反，它需要增加曝光的时间和光照强度。这不仅影响了荧光蛋白的光稳定性，所有的荧光蛋白会很快被漂白，而且也会影响到细胞的活性。各公司出售不同的滤光片组件，作为一系列显微镜的配件，因为要选择最适合的滤光片，以符合特定荧光蛋白变体的要求。当然，最理想的是配备各种不同的滤光片组件［16，55］。

荧光蛋白用作报告基因时，应当注意细胞的一系列代谢物和结构组分发出自身荧光的问题，这种荧光一般被称为自发荧光。由于自发荧光谱很广，常常包含了大部分可见光，所以不可避免地会与GFP，以及其他荧光蛋白的发射光谱相重叠。在植物材料中，自发荧光最主要的来源是叶绿素、多酚类、木质素、纤维素和液泡组分，但是培养基和一些固定方法会产生高强度干扰性自发荧光。精心地选取特定荧光蛋白变体和滤光片，可以减少观察个别组织时遇到的各种麻烦（见注36）。此外，当表达量很低，且研究人员经验不足时，很重要的一点是将转基因与非转基因材料对比观察。

为了提高荧光蛋白的检测效果，许多实验室构建载体将荧光蛋白用于亚细胞定位，其好处是将信号集中在低水平扩散的荧光背景，产生可清晰观察的图像。这种模式与低水平扩散的荧光截然相反，就样品的自发荧光而言，荧光蛋白的光谱特性并未有多大区别（见注37）。

另一种增强FP检测效果的方法是遗传级联效应。FP与其他报告基因的不同在于其检测过程中没有建立酶的级联放大效应，这就意味着该检测方法比GUS或者LUC的检测敏感性更低。所研究的启动子与反式激活蛋白如gal4：vP16相融合，荧光蛋白受顺式元件控制，反式激活蛋白又与顺式元件结合，这样便提供了级联效应的一种方法［43］。

图3.1（c）显示的是发芽中的小麦种子，它源于稳定导入了水稻“actin启动子-GFP”载体的转基因植株。GFP是sGFP S65T变体，图像在莱卡MZF1 III型荧光立体显微镜下拍摄，该显微镜安装了莱卡DFC300FX数码相机，并配备莱卡GFP2型滤光片（见注42）。

（1）首先用落射荧光显微镜观察材料。

（2）打开汞灯（见注38），首先检查光阑是否在原位。

（3）将活体组织（整体包埋或切片的材料）置于载物台上（见注39~42）。

（4）用透射光聚焦显微镜。

（5）选择滤光片（见注43），移开汞灯光阑，观察样品（见注44）。

（6）根据需要捕捉图像（见注45）。

（7）如果需要的话，可以使用共聚焦显微镜观察材料（见注46）。

3.7　花青素表达的定量

3.7.1　瞬时表达研究

植物组织经基因枪转化培养大约 12 h 后，转化细胞开始表现出深红色或者偶尔为深蓝色的斑点。颜色常常会向整个液泡扩散，从外表上看整个细胞都是红色的。在几天时间里，颜色将会增强，并且能在 1~2 周内保持稳定。对于有些细胞来说，其深色液泡内含物中的花青素或者 AVI［27］会隐退，或者随着时间的推移慢慢地沉积下来，在这种情况下个体转化细胞更难以判断。尽管大量的细胞积累花青素后，可以用肉眼观察，但是统计转化细胞数目需要一台低倍立体显微镜。如图 3.1（d）所示，小麦品种 Cadenza 还在发育的糊粉层细胞，瞬时表达转化小麦 8S 球蛋白启动子控制的玉米 *C1* 和 *R-Lc* 基因。只有这两种载体 DNA 按相同摩尔数混合并通过基因枪转化，才能看到花青素积累。培养 3 天后，利用莱卡 MZ8 型立体显微镜拍摄，该显微镜配备莱卡 DFC300FX 型数码相机。

3.7.2　通过吸收光谱对植物提取物花青素进行定量

通过组织提取、535 nm［56］处光吸收值等方法，或者通过图像分析来对花青素定量［57］。可以通过高效液相色谱（HPLC）对各种花青素进行定量分析和种类鉴定，或者通过蒸发，将相同的植物提取物浓缩，利用液相色谱质谱（mass spectrometry）联用（LC-MS）技术进行鉴定［58］。

（1）取 200 mg 样品于 3 ml 酸性乙醇或甲醇中（乙醇与 0.1 mol/L 的 HCl 的体积比为 85：15，pH1.0），匀浆组织。

（2）用 4 mol/L 的 HCl 调 pH 至 1.0，用力振荡 30 min。根据需要，重新调 pH 至 1.0。

（3）重新振荡 30 min，27 000 *g*，5℃离心 15 min。

（4）将提取物置于 5℃，48 h，27 000 *g*，5℃离心 15 min，然后用 0.45 μm 滤膜过滤。

（5）加酸性乙醇至体积为 3 ml。

（6）用溶剂设置空白对照，测量 535 nm 处的吸光值，计算花青素总含量。购买合适的标准花青素如花青素-3-*O*-葡萄糖苷，绘制标准曲线；参照曲线，对样品中的花青素含量进行定量。

3.7.3　通过成像分析定量花青素

可以通过成像分析，测量色素强度，从而对花青素进行定量。

（1）取 1 μl 溶于酸性乙醇的已知浓度的系列花青素-3-*O*-葡萄糖苷（0~400 μg/ml）于载玻片上，用数码相机采集图像。色彩强度和色素与花青素-3-*O*-葡萄糖苷之间的相关系数通过合适的软件进行处理。

（2）参照上述操作，在相同条件下采集样品图像。

3.8 小结

当使用报告基因检测基因或蛋白质表达时，重要的一点是要意识到，你正在建立一种人工检测系统。任何植物启动子，从植物中分离出来，克隆到质粒上，再转化到新的基因组中，对于新基因组来说，这一基因内容与自身内源性的基因是不相同的。即使启动子表达所需的所有内源性顺式元件都包含在克隆的序列内，也不论新导入的启动子存在于基因的5′上游区域或者3′下游区域，还是存在于内含子的编码区内，甚至是其他邻近基因内，其与自身内源性基因所不同的事实无法改变。这些分离得到的启动子，会受到质粒序列和新的基因组位点上的隐性顺式元件，以及载体内部其他一些强的启动子的影响，如CaMV 35S或者玉米Ubi启动子的影响，而Ubi启动子常被用来控制转化选择标记。因此报告基因的表达模式应该得到其他结果的支持，如原位杂交，事实上，许多刊物不会报道仅仅以报告基因启动子载体为基础的研究结果。

另一个问题与报告基因的表达水平相关。一些文章提出报告基因的高水平表达与转基因过程中的植株再生能力存在负相关性。至今仍不清楚，这是否表明报告基因有毒性，或者使细胞再生潜能受到抑制；还是仅仅反映出有高水平表达基因的细胞，其再生能力的不同取决于发育时期。从总体结果来看，仅仅根据报告基因的表达进行选择，得到的转化效率较低［21，22，40，59］。

在某些转化事件中，报告基因的高水平表达还会导致基因沉默。基因沉默可以是组织特异性或细胞特异性的发生，常常导致同一转基因系的报告基因表达模式发生一系列的变化，这可能与检测阈值有关；而且这种现象在后代中会变得更加明显。基于这个原因，谨慎的做法是分析10~20个带有特定基因载体的独立转化植株。报告基因高水平的表达也可能导致细胞内GFP的沉默或者异位表达，还可能导致那些仍可发出荧光的嵌合蛋白发生聚合；这项工作需要免疫细胞化学技术来验证，不同表达水平的株系间分析结果所提供的信息也是有价值的。

此外，应该指出的是，不同细胞的内部结构和体积存在很大的差异，因此，一种类型的细胞与另一种类型的细胞相比，虽然可能有着相同水平的基因表达，但是在一个细胞中会出现报告基因的含量或者浓度明显的不同。在这种情况下，良好的植物生理学背景知识可以避免对数据的过度阐释。

4. 注释

注1：随着研究的深入，已经对大肠杆菌来源的*GUS*基因进行了不同的修饰，包括翻译起始位点的增强和糖基化位点的去除，从而通过分泌系统对蛋白质进行加工［1，60］。如果把GUS用于农杆菌介导的转化系统，最好从多个*UidA*变体中选一个合适的变体，其编码区还导入了内含子，因为这样会阻止共培养之后残存的细菌本身进行低水平的*GUS*基因表达。UidA蛋白对N′端和C′端的融合蛋白具有耐受性，另外一些载体经过设计以增强其耐受性［42，61］。

注2：所有野生型荧光蛋白的激发光谱会随着蛋白质浓度的变化而变化，表明蛋白

单体之内存在某种形式的互作，但是，虽然 GFP 属于二聚体蛋白，其他来源的荧光蛋白可能严格意义上表现为寡聚体。这类野生型的寡聚体在使用时似乎产生很大问题。幸运的是，通过筛选获得了其单体蛋白，并已广泛应用［16］。

注 3：必须掌握消光系数（光吸收量）、量子产率（以荧光形式发光的百分数）、荧光蛋白的相对漂白率（发色团在有氧条件下的光化裂解）等信息。例如，低消光系数、低量子产率而高光漂白的荧光蛋白需要用更高的光强进行检测，同时会导致大量自由基的产生。这两个方面都会损伤细胞，并在细胞发育过程中产生显著变化。同样的，短波长的光是高能量的，因此会造成更大的损伤，这样也就限制了蓝色荧光蛋白（BFP）的使用。对于 FRET 和 BiFC 这样的技术，虽然供体发射光谱和受体吸收光谱之间的重叠应该最小化，但是供体的发射光谱必须要明显地覆盖受体的吸收光谱，基于这个原因，YFP 和 CFP 常常被同时使用。

注 4：通常 GUS 对反应条件非常有耐受性，但在巯基还原剂（β-巯基乙醇或者 DTT）存在下其活性最高。GUS 还可能被一些二价重金属离子（Cu^{2+}、Zn^{2+}）所抑制，所以常常在检测缓冲液中添加 EDTA［1］。

注 5：缓冲液中加氰化铁和氰化亚铁盐可以加速不溶性靛青产物的形成，从而减少 5-溴-4-氯吲哚从酶的活性中心扩散，使染色更精确、更清楚。然而，这也会抑制 GUS 酶的活性，因此折中办法是根据经验在 0.5～10 mmol/L 之间确定一个最优浓度。在 GUS 酶表达水平低的情况下，氰化铁和氰化亚铁盐能够将酶的活性减少到无法检测的水平。对于任何一种新的材料，最好添加一个去盐的实验作对比。

注 6：在长时间的反应过程中，可以在反应液中添加一些常用的抗生素，以抑制细菌和真菌的生长，因为这些微生物有着非常高的 β-葡萄糖醛酸苷酶活性。

注 7：如果组织很容易氧化褐变，那么在 HGUS 缓冲液中添加 10～100 mmol/L 抗坏血酸盐以减少褐化。

注 8：使用 LUC 检测方法测量样品的酶含量而不是检测 ATP 浓度的情况下，灵敏度非常重要，所以需要提供高含量的 ATP。在此条件下，反应会产生一个起始发光（<10s），它会快速衰减到一个稳定的低水平状态。在这种情况下，反应的起始需要在光度计计数池内快速而完全地混合初始反应物。为了产生一个可以持续至少 1 min 的线性发光反应，需要加入高浓度的 CoA［6］。

注 9：可以购买商业化的 LUC 分析试剂盒，本方法使用的缓冲液与试剂盒的缓冲液基本相似。

注 10：液氮速冻材料，可以于-80℃保存。

注 11：采用一种适合自己的蛋白质分析方法。

注 12：一般情况下，最好立即使用提取物，因为有些材料-80℃冻存可能会导致 GUS 活性发生不确定的变化。

注 13：首先，必须洗掉原生质体上的培养基成分，这些成分干扰检测反应。注意要包含一份未转化的原生质体。

注 14：检测反应一般会很稳定，很少会遇到问题，使得在一些情况下非常低的 GUS 水平也可以被检测出来。然而，这种情况增加了底物非酶催化而分解的可能性，

或者检测到低水平的内源性葡萄糖醛酸苷酶活性。类似地，一些组织的某些化合物具有自身荧光或吸收荧光，从而掩盖被检测的荧光信号，或者这些化合物抑制检测反应。为了确定这些可能性，应该包含合适的未转化对照，同时也应该进行实验重建分析。为了做到这一点，要将等同于0 μg、1 μg、2 μg、5 μg 蛋白质的未转化对照植株提取物加入到0.2~1.0 ng 提纯的GUS 酶中。按照上面的方法进行分析，在植物提取物存在或者缺少的情况下，绘制荧光与GUS 酶之间的关系曲线。如果植物提取物会显著影响纯化酶的活性，那么减少提取物的使用量或者反应时间可能会解决这个问题；如果组织中内源性葡萄糖醛酸苷酶活性很高（见注16），则有必要对提取物进行部分纯化（见注15）。

注15：有些原生质体和组织会产生能够干扰MU 荧光的酚类化合物［62］，这种情况下，将5~10 mg 的酸性交联聚乙烯吡咯烷酮（Polyclar AT）添加到提取组织的GUS 缓冲液中。按如下步骤，在1.5 ml 离心管中准备1.0 ml 经过GUS 缓冲液平衡过的Sephadex G25 离心柱，用注射器针头在离心管底部穿一个小孔，在管底铺一层20~30 μl的玻璃珠粉（直径为0.1~0.2 mm）。向离心管中加满GUS 缓冲液平衡过的葡聚糖凝胶G25 悬浮液，没过珠粉，并放入到另一只能够使其悬挂的离心管上。450 *g* 离心4 min，换一只新离心管，之后制备管就可以使用了。将原生质体提取物铺在葡聚糖凝胶上部，450 *g* 离心4 min。向制备管中再次加入50 μl 的GUS 缓冲液，450 *g* 离心4 min。此外，有必要将 Na_2CO_3 的浓度从0.2 mol/L 增加到1 mol/L，以终止MUG 试验。

注16：最初研究表明，加甲醇到反应缓冲液中（体积比达20%）可以有效抑制内源性GUS 酶活性，但是对于有些组织来说，这样做还不够。后来经过对内源性GUS 活性与UidA 活性之间的详尽比较，确认通常情况下它们对抑制剂、糖二酸-1，4 内酯具有不同敏感性、热稳定性以及不同的最适pH，因此这两种活性可以被区别开来。一般来说，通过提高pH 至7.5，检测之前将组织于55℃预热1 h，似乎可以去掉内源活性，从而对UidA 活性进行分析［49］。由于内源性葡聚糖醛酸苷酶的活性水平由基因型决定，因此必须在所有的实验中都要有合适的未转化材料作对照。UidA GUS 活性较低时更需如此。如有必要，可以对基本的实验方法做适当的修改。

注17：材料的范围可以包括整个幼苗、叶片、根部或者205 mm 厚的徒手切片（由锋利的2~5 mm^3 的双刃刀片所切）。另外，切片机切出的200~300 μm 的切片也可以使用。除非在特定细胞器中定向表达，表达的UidA 一般在细胞质积累，因此，未经固定和非常小的样品染色会导致定位不准。如果材料将要包埋并做切片，那么应该使用切片机切片。

注18：可以通过轻便的预固定步骤来促进底物在组织内部的穿透性：0.1%~1.0%的戊二醛、25 mmol/L 的 Na_3PO_4（pH7.0）浸泡组织，真空渗透，冰浴30 min。之后，用凉水或磷酸盐缓冲液冲洗样品5 min，重复3 次；或采用不同的预固定步骤，包括冰冷的90%丙酮浸泡组织，然后冰上保湿20 min，或者用含有2%多聚甲醛、100 mmol/L Na_3PO_4（pH7.0）、1 mmol/L EDTA 的缓冲液浸泡，冰上30 min。备注：戊二醛和多聚甲醛溶液最好现配现用，不要使用混浊褪色和存于废液罐中的预固定液。对于任何一种新的材料，试验中也应该包含未经固定的样品，以确定固定处理对葡萄糖醛酸活性及染色所造成的影响。

注 19：在此期间，应监测染色反应过程，一旦染色到足够深的程度，即终止 GUS 反应。然而要注意的是，如果组织表达的 GUS 活性低，大多数样品中存在的叶绿素会遮盖 GUS 反应产生的颜色。

注 20：固定时需要换几次乙醇。即使实验的目的是观察那些没有经过包埋和切片的材料，为了加快样品的透明过程，在用 25% 乙醇浸泡材料之后，将其浸泡于新鲜配制的 FAA 溶液（5% 甲醛、5% 乙酸、40% 乙醇）中 10 min。像种子这样的材料，透明过程尤其困难，可以参考文献［63］。

注 21：完成染色之后的固定、包埋、切片，可以参照任意一种最适合于材料的常规方法，包括被 FAA 或者戊二醛固定方法。关于普通植物显微技术，参照文献［64］。切片一旦包埋，最好切得厚点，至少 2~3 μm，以便染成足够的蓝色，而且要在相差显微镜下观察切片，以凸显未染色细胞的结构。

注 22：这种细胞裂解液含有高浓度的洗涤剂（>0.1%）和巯基乙醇，所以测量蛋白质浓度会很困难。这时需要选择一种可以耐受这些试剂的特定蛋白检测分析方法［65］；或者将蛋白质提取物充分浓缩，然后对浓缩物进行适当稀释，就可以通过大部分方法来分析了。

注 23：对于手动光度计来说，可以将萤光素酶分析缓冲液分装到离心管中，通过添加裂解物来起始反应；对于机器注射来说，可以将样品放在离心管或者分析板上，通过添加分析缓冲液来起始反应。

注 24：使用闪烁计数器时，应该关闭脉冲重合电路。但是如果没有关闭电路，那么生物荧光与检测读数之间的线性关系可以用每分钟读数（cpm）减去背景 cpm 后的平方根来表示。样品可以直接放入闪烁瓶或者更小的离心管中，尽管这两种方式需要所有的样品以相同的方向放入闪烁瓶中。为了取得一致性，最好使用人工模式操作：打开所有通道，混合样品，分别读数。在适当延迟（10~20 s）之后，每 10 s 至 5 min 的间隔收集数据以减少背景影响，并且重要的是要确定闪烁计数器的线性范围。

注 25：光强度是萤光素酶催化效率的衡量指标，因此它取决于温度。萤光素酶活性的最适温度是 20~25℃。萤光素酶检测缓冲液要冰冻保存，使用前在室温下平衡至少 30 min。

注 26：将 1 fg 至 1 ng 的萤火虫萤光素酶（Promega 公司产品）加到 20 μl 裂解缓冲液中，进行系列稀释，添加 1 mg/ml SBA。按照上述方法进行分析。

注 27：为了促进吸收，可以添加终浓度为 0. 01% 的非离子型去污剂，如 Tween-80，但是有些去污剂对叶片造成坏死性损伤，影响植物发育［7］，所以要检查是否会出现这种情况，在实验室中添加合适的对照，或在生长培养基中加萤光素到 1 mmol/L 的浓度，让根或植物离体器官吸收。对于具有特殊结构的植物器官，如成熟种子，更容易出现萤光素渗透问题，所以需要在检测 LUC 之前产生伤口，促进底物吸收［52］。

注 28：当植物细胞 CoA 处于低水平时，氧化萤光素缓慢地从酶复合物释放，细胞内积累的 LUC 将会产生一个高水平的起始发光，然后在数小时之内慢慢衰减。在数天之内对植物喷洒萤光素，以去除积累的所有 LUC 酶，喷洒数量取决于启动子的强度及被分析的特定植物组织。最好列一个时间表，记录光产量不再增加或者组织的特定表达

模式不再变化的时间。注意，根据报道，高水平的萤光素会对一些细胞和组织产生毒性，所以在特定的检测系统中要检查是否有这种情况。

注29：因此，对于在低温条件下拍摄的相机，需要使用一种能够通过560 nm波长、阻止超过600 nm波长的滤光片，或者在曝光之后延迟5~10 min进行拍照［53］，以解决叶绿体自发荧光的问题，叶绿体自发荧光在685 nm处有最大发射波长。相反，pH不仅影响LUC活性，在pH低于7.0时也会使生物荧光偏向光谱的红色区域。因此，在使用增强CCD相机时，如果得出LUC活性的明显下降与细胞内pH变化无关这一结论，则一定要谨慎［7］。所以，用LUC进行亚细胞定位可能需要慎重考虑，因为不同细胞器的pH水平不同。

注30：注意，相机冷却到-120℃的工作温度需要大约2 h。警告：放置CCD相机的暗室应该通风良好，以避免液氮蒸发而损耗氧气。最好监测暗室内的氧含量。

注31：在使用制冷CCD相机时，为了减少光合组织中叶绿素自发荧光的背景，在拍摄图片之前要将材料放在暗室处理。如果需要的话，可在安全的绿光下进行操作。

注32：曝光时间的长短取决于许多参数，最重要的是控制报告基因表达的启动子的强度。所用的镜头和光圈（f-stop）也将会影响曝光时间。像CaMV 35S这样强的组成型启动子在1~5 min的曝光时间内很容易拍照；对于其他启动子，曝光30 min也不奇怪［8］。

注33：传感器也会检测到宇宙射线，但是这些射线与表达LUC植物的激发光不同，常常表现单一高强度的像素。未转化对照植株的图片应该与检测到的宇宙射线的图片有相似性，这些射线的强度取决于太阳活动。

注34：要记住分辨率的提高是以牺牲发射信号的强度为代价的，因此，共聚焦成像不一定可以增强低信噪比的弱信号。

注35：使用荧光显微镜时，紫外线或激光器发出的光首先会被激发光滤镜过滤掉，而该滤镜只允许被选择的波长通过样品。双色镜（或者分光镜）的功能是使激发光射到样品，同时让返回的发射光传递至只允许选定发射波长通过的吸收滤光片。滤光片分为短波长滤光片或者长波长滤光片（指波长），或者带通滤光片，其波段可宽可窄。带通滤光片更具特异性，但产生的信号弱，而长波长滤光片会产生更强的信号，但是背景信号更强。

注36：处理该问题的其他途径包括采用双波长激发或者发射修正，即样品被两个波长连续激发，一个激发荧光蛋白，另一个激发自发荧光；或者在两个波长下捕捉图像数据，之后图像修正会将检测到的荧光光谱区分开来。使用化学试剂猝灭自发荧光，文献中也有记载［55］。

注37：应该记住的是，只有当发色团包埋在蛋白质空间结构的内部时才会发出荧光；变性的荧光蛋白发光很差，即使发光，残缺的荧光蛋白最终也会导致荧光的丢失。因此，任何融合蛋白必须要正确折叠，这个参数只能靠实验经验来建立。荧光蛋白的信号强度也会受到其所在位置的影响。例如，在液泡里，蛋白质水解作用会发生；而在细胞壁上时，低水平的pH会妨碍荧光蛋白，尤其是YFP的功能。

注38：警告：使用汞灯时需要注意，使用前请参考仪器制造商的安全信息；紫外

灯会损伤人眼，眼睛不可以直视紫外灯。显微镜要安装合适的安全显示屏，以完整显示载物台的样品。

注 39：对于落射荧光检测器来说，样品可以浸入水中或简单培养基中，也可以透过空气观察（注意材料不能脱水）［66］。注意有些培养基会有极强的自发荧光，使用前要进行检查。对于更高能量的显微镜和共聚焦显微观察，必须要将样品放在距离物镜更近的位置，并浸于水或者培养基中，再覆一张厚度合适的盖玻片。

注 40：注意确保材料尽可能少地受胁迫条件影响，例如，材料长时间放在盖玻片之下会产生缺氧环境；但是反过来，如果样品没有浸在水中，在光照下会很快变干。一般来说，死的、干的或是受胁迫影响的细胞会产生更高水平的自发荧光。从发育角度来说，获得数据会有问题，所以样品是否保持在最佳状态至关重要。可以查询一些详细介绍活体植物材料成像的综述文献［18，66］。有时还要在显微镜明视野下检查不同条件下的未转化植物材料。荧光蛋白在细胞中一般不会产生毒性（toxic）（四聚体形式可能是一个例外）；但是形成发色团需要 O_2，其结果是会产生与蛋白分子数相同的 H_2O_2。这可能解释了先前关于 GFP 高效表达对植物会有毒性的报道［59］。内质网的亚细胞定位似乎可以解决这个问题。定位的荧光蛋白也可能会防止固定剂产生的假象，因为细胞会通过共质体连接而渗漏少量的荧光蛋白。

注 41：在进行固定和包埋的材料里也能观察到 GFP，但是自发荧光常常会增强，并且 GFP 荧光可能会由于在乙醇中脱水而受到负面影响［55］。

注 42：如果需要的话，可以对材料进行复染，以显示细胞结构。例如，根尖细胞壁在 10μg/ml 的碘化丙啶溶液中预染几分钟后，拍摄效果会增强。

注 43：对于 GFP 来说，有三种常用的滤光片：GFP1（Ex425nm［60］、DB470nm、Em480nmLP）；GFP2 或 GFP Plus（Ex480nm［40］、DB505LP、Em510nmLP）；GFP3 或 GFP Plant（Ex470nm［40］、DB495nm、Em525［50］）。为了辨别观察到的荧光是来自荧光蛋白还是植物材料的自发荧光，选择正确的滤光片非常重要。在某些情况下，窄通发射滤光片可能区分不了自发荧光和荧光蛋白，而长波长发射滤光片则可以将它们区分开来。为了帮助确定荧光是否来自你研究的荧光蛋白，必须同时研究未转化的和转化的植物材料。

注 44：紫外灯会损伤样品，而且时间长了会漂白 FP，所以要将汞灯的曝光时间限制到最低程度。

注 45：图像的获取和操作对研究人员来说是十分重要的技能。图像中 GFP 的定量可以通过合适的软件来实现（见第 3.4 节）。

注 46：共聚焦和广视野显微镜的操作指南可从网上下载［67］。

（赵建华　瞿绍洪　译）

参考文献

1. Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
2. Guivarch, A., Caissard, J. C., Azmi, A., Elmayan, T., Chriqui, D. and Tepfer, M. (1996) *In situ* detection of expression of the gus reporter gene transgenic plants: ten years of blue genes. *Transgenic Res* . **5**, 281-288.
3. Martin, T., Wohner, E. R., Hummel, S., Willmitzer, L., and Frommer, W. B. (1992) The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression, in *GUS Protocols*, (Gallagher, S. R., ed.), Academic, San Diego, pp. 23-39.
4. Sherf, B. A. and Wood, K. V. (1994) Firefly luciferase engineered for improved genetic reporting. *Promega Notes* **49**, 14.
5. Lonsdale, D. M., Moisan, L. J. and Harvey, A. J. (1998) The effect of altered codon usage on luciferase activity in tobacco, maize and wheat. *Plant Cell Rep.* **17**, 396-399.
6. Ford, S. R. and LF, R. (1998) Improvements in the application of firefly luciferase assays, in *Bioluminescence Methods and Protocols*, (Robert A. LaRossa, ed.) Humana, Totowa, pp. 3-20.
7. Leeuwen van, W., Hagendoorn, M. J. M., Ruttink, T., van Poecke, R., van der Plas, L. H. W. and Kvd, A. R. (2000) The use of the luciferase reporter system for in planta gene expression studies. *Plant Mol. Biol. Rep.* **18**, 143a-143t.
8. Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. H. and Kay, S. A. (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* **4**, 1075-1087.
9. Kay, S. A., Millar, A. J., Smith, K. W., Anderson, S. L., Brandes, C. and Hall, J. C. (1994) Video imaging of regulated firefly luciferase activity in transgenic plants and *Drosophila*. *Promega Notes***49**, 22.
10. Luehrsen, K. R. and Walbot, V. (1993) Firefly luciferase as a reporter for plant gene expression studies. *Promega Notes* **44**, 24.
11. Welsh, D. K. and Kay, S. A. (2005) Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 73-78.
12. Harwood, W. A., Ross, S. M., Bulley, S. M., Travella; S., Busch, B., Harden, J. and Snape, J. W. (2002) Use of the firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. *Plant Cell Rep.* **21**, 320-326.
13. Bourdon, V., Ladbrooke, Z., Wickham, A., Lonsdale, D. and Harwood, W. (2002) Homozygous transgenic wheat plants with increased luciferase activity do not maintain their high level of expression in the next generation. *Plant Sci.* **163**, 297-305.
14. Calderon-Villalobos, L. I. A., Kuhnle, C., Li, H. B., Rosso, M., Weisshaar, B. and Schwechheimer, C. (2006) LucTrap vectors are tools to generate luciferase fusions for the quantification of transcript and protein abundance *in vivo*. *Plant Physiol.* **141**, 3-14.
15. Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. and Tsien, R. Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci* . **20**, 448-455.
16. Shaner, N. C., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905-909.

17. Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermo-sensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol*. **6**, 1653-1663.

18. Dixit, R., Cyr, R. and Gilroy, S. (2006) Using intrinsically fluorescent proteins for plant cell imaging. *Plant J*. **45**, 599-615.

19. Brandizzi, F., Fricker, M. and Hawes, C. (2002) A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **3**, 520-530.

20. Huber, M., Hahn, R. and Hess, D. (2002) High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum aestivum* L. cv. 'Combi') by microbombardment of immature embryos followed by GFP screening combined with PPT selection. *Mol. Breed*. **10**, 19-30.

21. Murray, F., Brettell, R., Matthews, P., Bishop, D. and Jacobsen, J. (2004) Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Rep*. **22**, 397-402.

22. Jordan, M. C. (2000) Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Rep*. **19**, 1069-1075.

23. Cho, M. J., Choi, H. W., Okamoto, D., Zhang, S. and Lemaux, P. G. (2003) Expression of green fluorescent protein and its inheritance in transgenic oat plants generated from shoot meristematic cultures. *Plant Cell Rep*. **21**, 467-474.

24. Remans, T., Schenk, P. M., Manners, J. M., Grof, C. P. L. and Elliott, A. R. (1999) A protocol for the fluorometric quantification of mGFP5-ER and sGFP (S65T) in transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Rep*. **17**, 385-395.

25. Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*. **126**, 485-493.

26. Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Ann. Rev. Plant Biol*. **57**, 405-430.

27. Irani, N. G. and Grotewold, E. (2005) Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *BMC Plant Biol*. **5**, 7-22.

28. Holton, T. A. and Cornish, E. C. (195) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.

29. Mol, J., Grotewold, E. and Koes, R. (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci*. **3**, 212-217.

30. Yoder, J. I., Belzile, F., Tong, Y. and Goldsbrough, A. (1994) Visual markers for tomato derived from the anthocyanin biosynthetic pathway. *Euphytica* **79**, 163-167.

31. Cone, K. C., Cocciolone, S. M., Burr, F. A. and Burr, B. (1993) Maize anthocyanin regulatory gene PL is a duplicate of C1 that functions in the plant. *Plant Cell* **5**, 1795-1805.

32. Consonni, G., Geuna, F., Gavazzi, G. and Tonelli, C. (1993) Molecular homology among members of the R-gene family in maize. *Plant J*. **3**, 335-346.

33. Ludwig, S. R., Bowen, B., Beach, L. and Wessler, S. R. (1990) A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* **247**, 449-450.

34. Goff, S. A., Klein, T. M., Roth, B. A., Fromm, M. E., Cone, K. C., Radicella, J. P. and Chandler, V. L. (1990) Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B-regulatory genes into maize tissues. *EMBO J*. **9**, 2517-2522.

35. Lloyd, A. M., Walbot, V. and Davis, R. W. (1992) Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production

activated by maize regulator-R and regulator-C1. *Science* **258**, 1773-1775.

36. Koes, R., Verweij, W. and Quattrocchio, F. (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* . **10**, 236-242.
37. Shin, Y. M., Park, H. J., Yim, S. D., Baek, N. I., Lee, C. H., An, G. H. and Woo, Y. M. (2006) Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. *Plant Biotech. J.* **4**, 303-315.
38. McCormac, A. C., Wu, H. X., Bao, M. Z., Wang, Y. B., Xu, R. J., Elliott, M. C. and Chen, D. F. (1998) The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* **99**, 17-25.
39. Johanson, P. F. and Laudoyer, O. (1995) Future uses in plant biotechnologies in plant improvement Monsanto's work in wheat transformation. Available online: http: //www. ressources. ciheam. org/om/pdf/a22/95605374. pdf.
40. Chawla, H. S., Cass, L. A. and Simmonds, J. A. (1999) Developmental and environmental regulation of anthocyanin pigmentation in wheat tissues transformed with anthocyanin regulatory genes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* **35**, 403-408.
41. Bowen, B. (1992) *Anthocyanin Genes as Visual Markers in Transformed Maize Tissues*. Academic, Totowa.
42. CAMBIA. Available online: http: //www. cambia. org/daisy/cambia/home. html.
43. Johnson, A. A. T., Hibberd, J. M., Gay, C., Essah, P. A., Haseloff, J., Tester, M. and Guiderdoni, E. (2005) Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *Plant J.* **41**, 779-789.
44. Wenck, A., Pugieux, C., Turner, M., Dunn, M., Stacy, C., Tiozzo, A., Dunder, E., van Grinsven, E., Khan, R., Sigareva, M., Wang, W. C., Reed, J., Drayton, P., Oliver, D., Trafford, H., Legris, G., Rushton, H., Tayab, S., Launis, K., Chang, Y. F., Chen, D. F. and Melchers, L. (2003) Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Rep.* **22**, 244-251.
45. Goldsbrough, A. P., Tong, Y. S. and Yoder, J. I. (2996) Lc as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant J.* **9**, 927-933.
46. Bilang, R., Zhang, S., Leduc, N., Iglesias, V. A., Gisel, A., Simmonds, J., Potrykus, I. and Sautter, C. (1993) Transient gene expression in vegative shoot apical meristems of wheat after ballistic microtargeting. *Plant J.* **4**, 735-744.
47. *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression* (1992) Academic, San Diego
48. Hu, C. Y., Chee, P. P., Chesney, R. H., Zhou, J. H., Miller, P. D. and Obrien, W. T. (1990) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* **9**, 1-5.
49. Hansch, R., Koprek, T., Mendel, R. R. and Schulze, J. (1995) An improved protocol for eliminating endogenous beta-glucuronidase background in barley. *Plant Sci.* **105**, 63-69.
50. Van der Eycken, E., Terryn, N., Goeman, J. L., Carlens, G., Nerinckx, W., Claeyssens, M., Van der Eycken, J., Van Montagu, M., Brito-Arias, M. and Engler, G. (2000) Sudan-beta-D-glucuronides and their use for the histochemical localization of betaglucuronidase activity in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **19**, 966-970.
51. Fleming, A. J., Manzara, T., Gruissem, W. and Kuhlemeier, C. (1996) Fluorescent imaging of GUS activity and RT-PCR analysis of gene expression in the shoot apical meristem. *Plant J.* **10**, 745-754.
52. van der Krol, A. R., van Poecke, R. M. P., Vorst, O. F. J., Voogt, C., van Leeuwen, W., Borst-

Vrensen, T. W. M., Takatsuji, H. and van der Plas, L. H. W. (1999) Developmental and wound-, cold-, desiccation-, ultraviolet-B-stress-induced modulations in the expression of the petunia zinc finger transcription factor gene ZPT2-2. *Plant Physiol*. **121**, 1153-1162.

53. de Ruijter, N. C. A., Verhees, J., van Leeuwen, W. and van der Krol, A. R. (2003) Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biol*. **5**, 103-115.

54. van Leeuwen, W., Ruttink, T., Borst-Vrenssen, A. W. M., van der Plas, L. H. W. and van der Krol, A. R. (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J. Exp. Bot*. **52**, 949-959.

55. Billinton, N. and Knight, A. W. (2001) Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem*. **291**, 175-197.

56. Abdel-Aal, E. S. M. and Hucl, P. (1999) A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem* . **76**, 350-354.

57. Doshi, K. M., Eudes, F., Laroche, A. and Gaudet, D. (2006) Transient embryo-specific expression of anthocyanin in wheat. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* **42**, 432-438.

58. Abdel-Aal, E. S. M., Young, J. C. and Rabalski, I. (2006) Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. Agr. Food Chem* **54**, 4696-4704.

59. Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C. and Hodge, S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *P. N. A. S. USA* **94**, 2122-2127.

60. Farrell, L. B. and Beachy, R. N. (1992) Review of the use of the GUS gene for analysis of secretory system, in *GUS Protocols*, (Gallagher, S. R., ed.), Academic, San Diego, pp. 127-133.

61. Kavanagh, T. A., Jefferson, R. A. and Bevan, M. W. (1088) Targeting a foreign protein to chloroplasts using fusions to the transit peptide of a chlorophyll A/B protein. *Mol. Gen. Genet*. **215**, 38-45.

62. Huttly, A. K. and Baulcombe, D. C. (1989) A wheat alpha-AMY2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J*. **8**, 1907-1913.

63. Stangeland, B. and Salehian, Z. (2002) An improved clearing method for GUS assay in Arabidopsis endosperm and seeds. *Plant Mol. Biol. Rep*. **20**, 107-114.

64. Ruzin, S. E. (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy*. OUP, New York.

65. eNotes, P. (2007) Compatibility of the Pierce BCA protein assay with Promega lysis buffers and lytic assay reagents. Available online: http: //www. promega. com/enotes/ applications/ap0047_ tabs. htm

66. Shaw, S. L. (2006) Imaging the live plant cell. *Plant J*. **45**, 573-598.

67. *Microscope*, *Microscope Primers*. Available online: http: //micro. magnet. fsu. edu/primer/techniques/ confocal/index. html, http: //www. hi. helsinki. fi/amu/AMU% 20Cf _ tut/cf _ tut _ part1. htm, http: //www. olympusfluoview. com/theory/confocalintro. html.

第4章 基因枪法转化小麦

Caroline A. Sparks Huw D. Jones

摘 要：这里介绍一个完整而详细的获得转基因小麦的指导方法，这个方法使用基因枪将质粒DNA转移到小麦幼胚中，通过体细胞胚胎发生获得转基因植株。这也是目前小麦遗传转化最常用的方法之一，且具有较多的优点。不过，近年来随着一些更简便的小麦转化方法的逐步发展与完善，如农杆菌介导法或活体遗传转化技术等，小麦转化最常用的基因枪法也正在受到这些新技术的挑战。

关键词：小麦，基因枪法，粒子轰击，转基因植物

1. 引言

用于小麦遗传转化的基因枪法已发展成为一个强有力的技术平台，每轰击300份幼胚一般可以产生5~20个独立的转基因植株。与一般的农杆菌介导方法相比，首先，基因枪法不受小麦基因型的限制，且转化效率更高。当然，近年来随着农杆菌介导技术的广泛使用和不断优化，这种局面可能会改变。其次，基因枪法对相关载体的要求不高，可以用目标性状基因质粒与选择标记的质粒共同轰击。当然，基因枪法也有不足之处，其DNA整合方式通常更复杂而且含有更多的拷贝数。如果开展需监管部门批准的田间试验，或者需要明确转化基因与基因组DNA连接处位点附近的DNA序列，如通过序列步移方法找到转基因插入位点附近的DNA序列，则运用简单的DNA整合方式显得更为重要。

与其他物种相比，小麦只有为数不多的外植体组织适合组织培养再生植株。最常使用的组织是幼胚的盾片，通过基因枪法或者农杆菌方法，外源DNA很容易导入盾片并且形成愈伤组织。尽管小麦幼穗作为替代的组织已成功地用于遗传转化［1~7］，但本章主要介绍使用盾片作为外植体的方法。

这里所介绍的方法主要是依据20世纪90年代在Rothamsted Research工作的Paul Lazzeri及其他研究人员的研究结果，这些方法经过不断地改进和优化后形成目前的体系。在本章中，该方法分为以下几个连续的操作步骤：供体材料的制备、DNA金粉颗粒的包埋、粒子轰击，以及愈伤的诱导、分化和选择。该方法经过精细的调整后，已经成功运用于春小麦品种Cadenza（cpb-Twyford，UK）的遗传转化。由于特定基因型的组织培养过程的差异，对该方法进行适当的改进后，超过35个小麦品种和相关的基因型获得遗传转化植株，其中包括2个硬粒小麦品种 *T. turgidum* ssp. *Durum*［6，15］，还有硬粒大小麦杂交的新物种大小麦 *Tritordeum*［3，5，7，10，16］。此方法通常使用的选

择标记基因是草胺膦乙酰转移酶基因（*bar*）或者新霉素磷酸转移酶（nptII）基因，以及相应的选择试剂草胺膦（PPT）和遗传霉素 G418［13］。除此之外，也研究过使用其他标记基因和选择试剂组合。

不论是稳定表达还是瞬时表达的遗传转化，都已成为普遍使用的反向遗传学工具，用于验证小麦候选基因的功能。迄今为止，利用小麦转基因的方法，研究了包括谷蛋白的功能［15，17~32］、淀粉特性［33~36］、籽粒硬度［37，38，39］和穗发芽［40］等多个小麦重要功能性状。除此之外，瞬时表达和稳定表达的植株也经常用于研究小麦的启动子［34，41~45］

2. 材料

2.1 供体材料的种植

供体小麦植株的生长状况好坏对能否成功转化是至关重要的，因此，为了稳定地提供健壮的植株，按以下方式种植材料（见注 1）。

（1）土壤成分（Petersfield Products，Leicestershire，UK）：详见下表。

成分	数量
精细级泥炭土	75%
筛选过的灭菌肥土	12%
筛选过的无石灰粗沙	10%
中等大小蛭石	3%
奥绿肥（缓释肥，15N/11P/13K 添加微量元素）	2 kg/m^3
PG mix（14N/16P/18K 颗粒肥料添加微量元素）	0.5 kg/m^3

（2）种植：直径 21 cm 的塑料盆［Nursery Trades（Lea Valley）Ltd.，Hertfordshire，UK］种植 5 株。生长至 6~8 周时剪去多余的分蘖，每株保留 5 个分蘖。

（3）春化：对于冬小麦播种后需要 4~5℃处理 8 周。

（4）生长室条件：白天 18~20 ℃，夜晚 14~15 ℃，光照 16 h，光源使用 400 W 金属卤素灯（Osram Ltd.，Berkshire，UK），光强约为 700 μmol/(m^2 · s) 光合有效辐射单位（PAR）（见注 2）。

（5）浇水：起初所有植物都浇透水以满足植物对水分的需求，随后浇足够的水但盆内无明显积水。当根系生长至盆底部时，开始使用自动灌水系统。

（6）病虫害管理：限制进入生长室的次数和遵守温室管理的规章制度。感病植物要立即拔除。使用预防性的杀菌剂 Flexity（BASF，Cheshire，UK）防治白粉病。采用胡瓜钝绥螨 *Amblyseius cucumeris*（Fargro，West Sussex，UK）作为生物防治方法控制蓟马危害。

2.2 小麦颖果灭菌

70%乙醇

10%漂白消毒剂（Lever Fabergé Ltd.，Surrey，UK）
灭菌水（见注3）

2.3　基本培养基储存液成分

下面表格是各种基本培养基储存液的成分，包括大量元素（macrosalt）、微量元素（microsalt）、维生素（vitamin）、氨基酸、激素（hormones）和诱导试剂、选择试剂和琼脂凝胶，以及最终使用培养基的配制方法（见注3和注4）。

（1）大量元素

成分	MS 大量（10×）/(g/L)	L7 大量（10×）/(g/L)
NH_4NO_3	16.5	2.5
KNO_3	19.0	15.0
KH_2PO_4	1.7	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.7	3.5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（见注5）	4.4	4.5
灭菌方式	121℃灭菌20 min	121℃灭菌20 min
保存条件（见注6）	4℃	4℃

（2）微量元素

成分	L7 微量（1000×）/(g/L)
$MnSO_4$（见注7）	15.0
H_3BO_3	5.0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	7.5
KI	0.75
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
灭菌条件（见注8）	一次配制100 ml，过滤除菌
保存条件（见注6）	4℃

（3）维生素

成分	MS 维生素（-甘氨酸）（1000×）/(g/L)	L7 维生素+肌醇（200×）/(g/L)
维生素 B_1	0.1	2.0
维生素 B_6	0.5	0.2
烟酸	0.5	0.2
肌醇	—	40.0
泛酸钙	—	0.2

续表

成分	MS 维生素（-甘氨酸）（1000×）/（g/L）	L7 维生素+肌醇（200×）/（g/L）
抗坏血酸	—	0.2
灭菌方式（见注 8）	一次配制 100 ml，过滤除菌	—
保存条件（见注 6）	4℃	每管 20 ml 分装，-20℃保存
储存-20℃		

（4）氨基酸

成分	3AA 氨基酸/（g/L）
L-谷氨酰胺	18.75
L-脯氨酸	3.75
L-天冬酰胺	2.5
保存条件（见注 6）	每管 40 ml 分装，-20℃保存

（5）激素和诱导试剂

激素/化学药品	浓度/（mg/ml）	溶质	灭菌方式（见注 8）	储存（见注 6）
2,4-二氯苯氧乙酸（2,4-D）	1	粉末用乙醇溶解，加水定容	过滤灭菌	每管 1 ml 分装，-20℃保存
玉米素（混合异构体）	10	用 1 mol/L HCl 溶解，加水定容	过滤灭菌	每管 1 ml 分装，-20℃保存
硝酸银（$AgNO_3$）（见注 9）	20	水	过滤灭菌	每管 1 ml 分装 -20℃避光保存
硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$）（见注 10）	25	水	过滤灭菌	每管 1 ml 分装 4℃保存

（6）选择试剂

选择试剂	浓度/（mg/ml）	溶质	灭菌方式（见注 8）	保存（见注 6）
草胺膦（见注 11）	10	水	过滤除菌	每管 1 ml 分装，-20℃保存
遗传霉素（G418）（见注 12）	50	水	过滤除菌	每管 1 ml 分装，-20℃保存

（7）琼脂

琼脂（2×）	浓度/(g/L)	溶质	灭菌方式	保存条件
琼脂	10	水	121℃灭菌 20 min	室温保存

2.4 诱导培养基

（1）MSS 3AA/2 9%S（2×）

成分	MSS 3AA/2 9%S（2×）
MS 大量	200 ml/L
L7 微量	2 ml/L
硫酸亚铁螯合物溶液（100×）	20 ml/L
MS（-glycine）维生素	2 ml/L
肌醇	200 mg/L
3AA 氨基酸（见注 14）	40 ml/L
蔗糖（见注 15）	180 g/L
pH	5 mol/L NaOH 或者 KOH 调 pH 至 5.7
渗透压	800~1100 mOsmol/L
灭菌条件（见注 8）	过滤除菌
保存条件（见注 6）	4℃

（2）MS 9% 0.5DAg：等体积的 MSS 3AA/2 9%S（2×）与灭菌后琼脂溶液（2×）混合。加入 0.5 mg/L 2,4-D（见注 16）和 10 mg/L $AgNO_3$，倒入直径 9 cm 的培养皿（大约每个培养皿 28 ml）。4℃黑暗保存（见注 1、注 13 和注 17）

2.5 分化培养基

（1）R（2×）

成分	R（2×）
L7 大量	200 ml/L
L7 微量	2 ml/L
硫酸亚铁螯合物溶液（100×）	20 ml/L
L7 维生素/肌醇	10 ml/L
麦芽糖	60 g/L
pH	用 5 mol/L 的 NaOH 或 KOH 调 pH 至 5.7
渗透压	269~298 mOsmol/L
灭菌方式（见注 8）	过滤除菌
保存条件（见注 6）	4℃

（2）RZDCu：等体积 R（2×）与灭菌后琼脂溶液（2×）混合，加入 5 mg/L 玉米素、0.1 mg/L 2，4-D 和 25 mg/L $CuSO_4$（见注 10），倒入直径 9 cm 的培养皿（大约每个培养皿 28 ml），4℃保存（见注 13 和注 17）。

2.6　选择培养基

（1）RZPPT4 或 RZG50：等体积 R（2×）与灭菌后的琼脂溶液（2×）混合，加入 5 mg/L玉米素，再加入 4 mg/L 草胺膦（PPT4）或者 50 mg/L G418（G50）（见注 18），倒入直径 9 cm 的培养皿（大约每个培养皿 28 ml）。4℃保存（见注 13 和注 17）。

（2）RPPT4 或 RG50：等体积 R（2×）与灭菌后的琼脂溶液（2×）混合，加入 4 mg/L草胺膦（PPT4）或者 50 mg/L G418（G50）（见注 18），倒入直径 9 cm 的培养皿（大约每个培养皿 28 ml）或者 GA-7 Magenta 容器（Sigma-Aldrich）（大约每个 60 ml）内。4℃保存（见注 13 和注 17）。

2.7　轰击材料、耗材

（1）金粉颗粒：0.6 μm（亚微米）金粉颗粒（BIO-RAD Laboratories，Hertfordshire，UK）（见注 20）（准备过程见 3.2 节步骤 1）。

	成分	浓度	溶质	灭菌方式（见注 8）	保存条件（见注 6）
1.	氯化钙（$CaCl_2 \cdot 2H_2O$）	2.5 mol/L	3.67 g 溶解于 10 ml 水中	过滤除菌	每管 50 μl 分装，-20℃保存
2.	亚精胺（见注 19）	1 mol/L	6.89 ml 无菌水加入到 1 g 亚精胺中溶解	—	每管 20 μl 分装，-80℃保存
		0.1 mol/L	无菌水 1∶10 稀释 1 mol/L 亚精胺储存液	—	每管 20 μl 分装立即-20℃保存

（2）载体膜（macrocarriers），终止屏，650 psi 或者 900 psi 破裂盘（BIO-RAD Laboratories）（见注 21）。

（3）质粒 DNA：质粒提取使用 Qiagen 大量提取试剂盒（Qiagen Ltd.，West Sussex，UK），使用灭菌水或者 TE 缓冲液（pH8.0）洗脱，质粒浓度调整至 1 mg/ml，每管分装 20 μl，-20℃保存（见注 22）。

3. 方法

3.1　准备供体材料

下面介绍的是经过优化的针对幼胚盾片转化的方法，幼穗可以代替幼胚盾片使用。对某些特定的品种，幼穗转化比幼胚盾片转化更有效，如普通小麦品种 *T. aestivum* vars. Baldus 和 Brigadier，以及其他小麦亚族 *Triticeae*；硬粒小麦品种 *T. turgidum* ssp.

durum 和小大麦（见注 23 和注 24）。

3.1.1　收集和消毒小麦颖果

（1）收集温室生长 10~12 周的小麦穗（见注 25）。

（2）从穗中剥出颖果（见注 26）。

（3）用 70% 乙醇将小麦颖果灭菌 5 min，然后用 10% 漂白消毒剂浸泡 15~20 min，中间晃动几次。

（4）用灭菌水至少洗三次。保持灭菌后颖果的湿度，但是不要浸泡在水中。

3.1.2　分离和预培养幼胚盾片

（1）在无菌环境中，显微镜下分离幼胚［图 4.1(a)］并且切除胚轴以防止萌发（见注 27）。

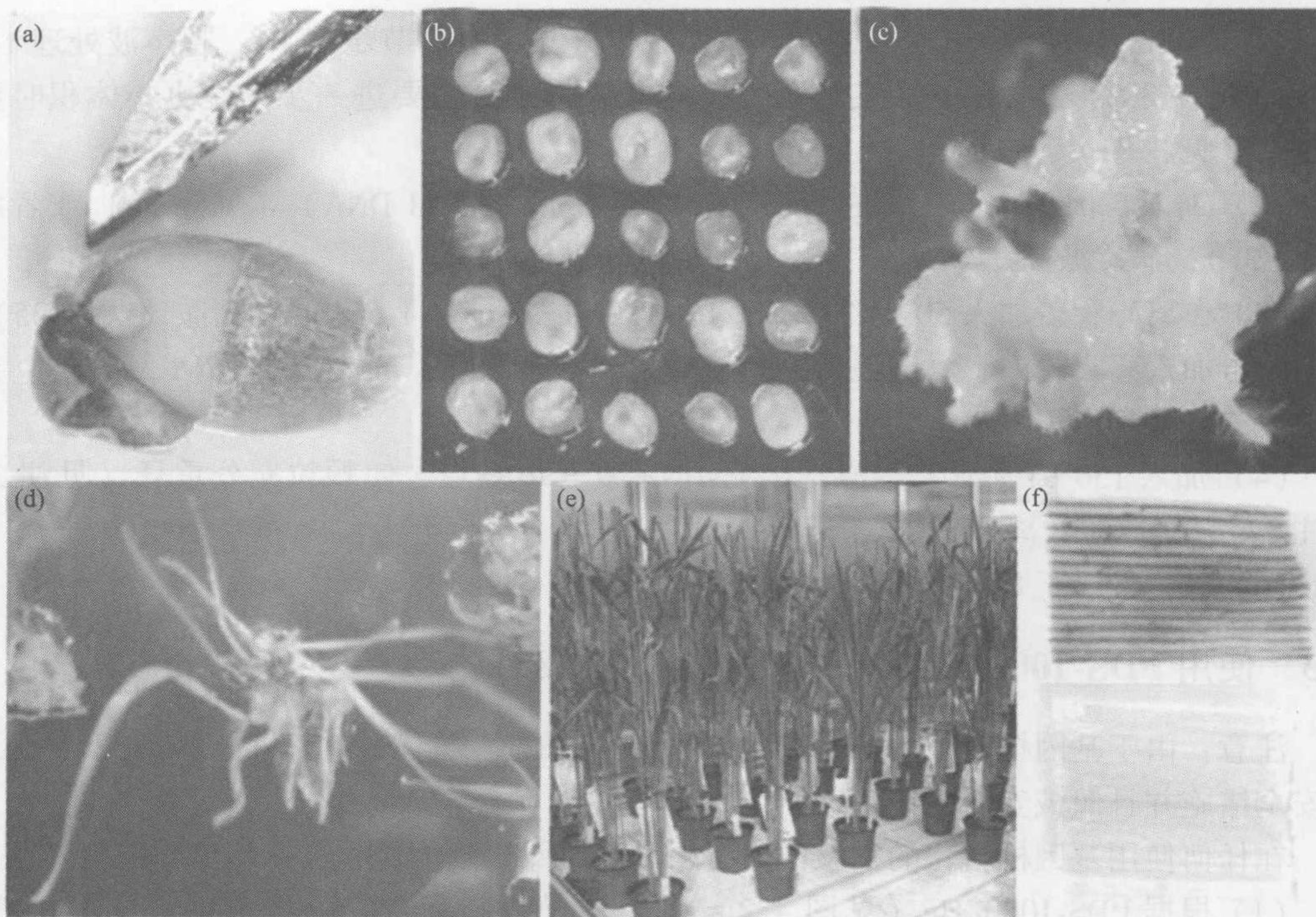


图 4.1　（a）从小麦颖果中分离幼胚；（b）将盾片铺在平板上准备轰击；（c）形成愈伤组织；（d）选择培养基上分化出小苗；（e）分化出的转化植株生长在 GM 控制的温室；（f）叶片上 β-葡萄糖苷酶基因的表达（上面）和对照（底部）（见图版）

（2）将 25~30 个盾片放置在包含诱导培养基（MS9% 0.5DAg）、直径 9 cm 的培养皿的中间区域，将胚的切面放置在培养基上，即完整的盾片作为轰击面［见注 28，图 4.1（b）］。

（3）使用封口膜 Nescofilm（Fisher Scientific UK）封好平板，轰击前将培养皿放在

22℃黑暗条件下预培养 1~2 天（见注 29）。

3. 2 DNA 包裹金粉颗粒

3. 2. 1 准备金粉颗粒

（1）称取 20 mg BIO-RAD 亚微米金粉（0. 6 μm）至 1. 5 ml 离心管中，加入 1 ml 无水乙醇。超声波处理 2 min，短暂离心 3 s，然后弃上清。重复用乙醇洗两遍。

（2）加入 1 ml 无菌水，超声波处理 2 min，短暂离心 3 s，然后弃上清。重复一次。

（3）加入 1 ml 无菌水，涡旋振荡重悬。每 50 μl 分装到 1. 5 ml 离心管，每次分装前用涡旋振荡混匀，确保金粉均匀分布。分装好后-20℃储存。

3. 2. 2 DNA 包裹金粉颗粒

下面的操作步骤最好在冰上无菌环境中操作。

（1）取出分装的 50 μl 金粉悬浮液室温融化（见第 3. 2 节步骤 1），超声波处理 1~2 min（见注 30）。然后涡旋混匀确保完全重悬，特别是需要进一步分装更小体积时更需注意（见注 31）。

（2）加入 5 μl DNA（TE 缓冲液或者水溶解的 1 mg/ml DNA）（见注 32）或者水（见注 33），涡旋振荡使 DNA 与金粉充分接触（见注 34）。

（3）在离心管盖加入 50 μl 2. 5 mol/L $CaCl_2$ 和 20 μl 0. 1 mol/L 亚精胺（见注 35），混匀后再加入离心管内。涡旋混匀，高速短暂离心 3~5 s，沉淀金粉-DNA 复合体。弃上清。

（4）加入 150 μl 无水乙醇漂洗金粉-DNA 复合体颗粒，使颗粒充分重悬（见注 36 和注 37）。高速短暂离心 3~5 s，沉淀金粉-DNA 复合体。弃上清。

（5）最后悬浮于 85 μl 乙醇中，放在冰上待用（见注 38）。

3. 3 使用 PDS-1000/He 基因枪轰击（见注 39）

注意：由于基因枪通过高压使粒子加速到极高的速度，故操作基因枪时应采取适当的安全措施并且佩戴安全眼镜。

在任何使用基因枪转化的实验中，必须设置对照检测分化和选择效率（见注 40）。

（1）根据 PDS-1000/He（见图 4. 2）基因枪操作指南操作，将 DNA 包埋的金粉（见第 3. 2 节步骤 2）转到组织中。下面的参数是按照标准设置的（见注 41）。距离 2. 5 cm（破裂盘到载体膜之间距离），阻挡板孔径 0. 8 cm（载体膜到终止屏之间的距离），目标距离 5. 5 cm（终止屏到被轰击样品平板距离），真空度 91. 4~94. 8 kPa，真空流速 5. 0，排气流量 4. 5 [8]。

（2）用 90% 乙醇对基因枪表面及样品室进行消毒，使乙醇能够完全蒸发。

（3）用无水乙醇浸没载体膜及其固定器、终止屏和破裂盘。放置在超净台使乙醇完全挥发（注 42）。将载体膜放置在固定器中，然后放在无菌的 6 cm 培养皿中。

（4）短暂涡旋混匀金粉-DNA 复合体颗粒（见第 3. 2 节步骤 2），取出 5 μl 点在载体

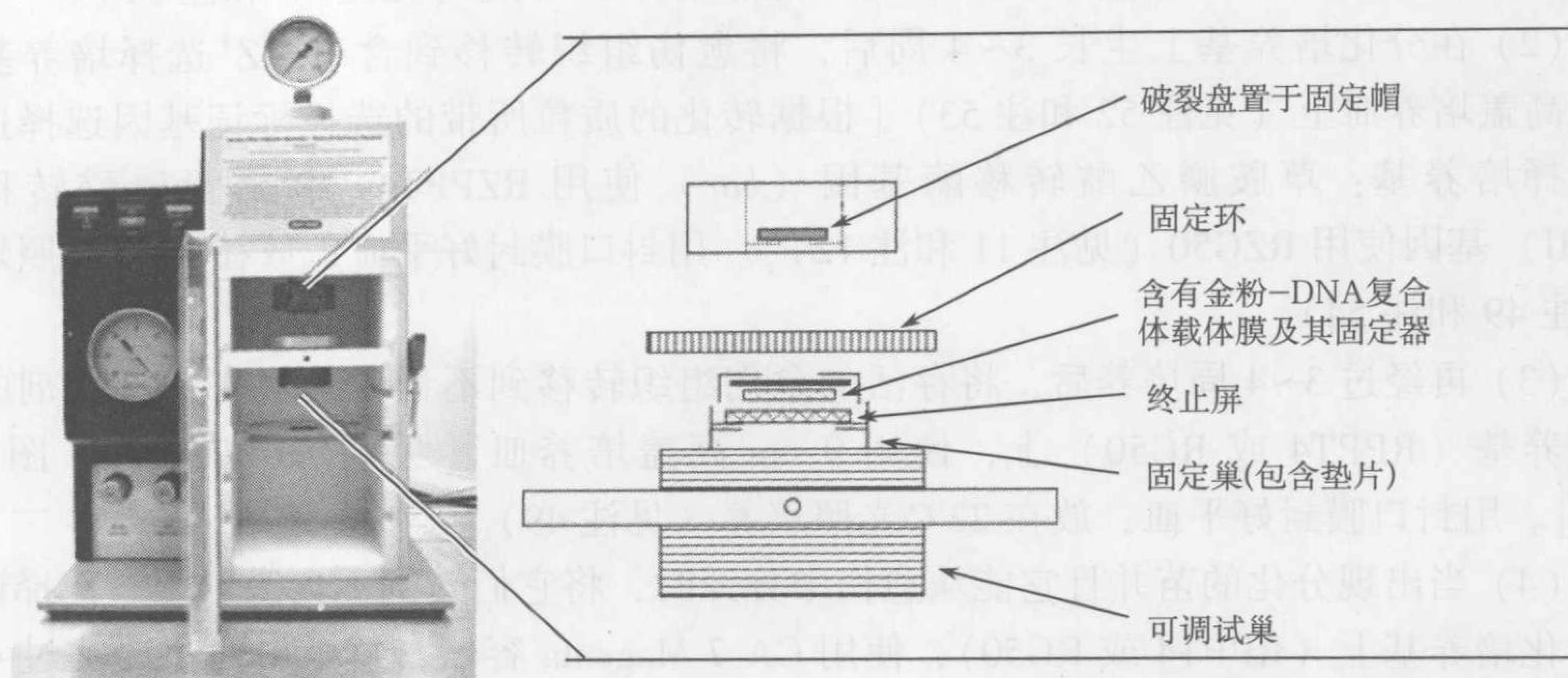


图 4.2　PDS-1000/He 基因枪（BIO-RAD）（左）和图中各组成部分，见第 3.3 节步骤 1 中的描述（右）

膜中央，晾至完全干燥。注意自然干燥，不要在超净台中干燥（见注 43）。

（5）将破裂盘（650 psi 或 950 psi）放在破裂盘挡盖中间（图 4.2）拧到气体加速器上，用专用板拧紧（见注 44）。

（6）将终止屏放在固定巢内。把载体膜固定器反过来，含有金粉-DNA 复合体的一面朝下放在终止屏上方，使用固定环保持其位置。将固定巢装在第二个架子上，使其距离顶部大约 2.5 cm（见图 4.2）。

（7）将样品放在轰击室中适当的位置，第四个架子距离上方大约 5.5 cm。

（8）抽真空，当真空度达到 91.4~94.8 kPa 时，激发（见注 45）。

（9）轰击后，释放轰击室真空，取出样品和拆卸装置，丢弃破裂盘和载体膜（见注 46）。

（10）如果要接着使用，将载体膜固定器和终止屏用无水乙醇灭菌；或者将它放入 1∶10 稀释的消毒液（Novartis Consumer Health，West Sussex，UK）浸泡。使用前用超声波处理 10 min（见注 47）。

3.4　轰击后未成熟盾片培养

3.4.1　诱导愈伤

（1）基因枪轰击后，将盾片分散转移，每个重复分到 2~3 个含诱导培养基（MS 9% 0.5 Dag）的平皿中，大约 10 个盾片一皿（见注 48）。

（2）用封口膜封好平皿，放在 22℃黑暗培养诱导愈伤［见注 49 和注 50，图 4.1（c）］。

3.4.2　分化和选择

（1）在诱导培养基上生长 3~5 周后，将含有体细胞胚的愈伤组织转移到含有分化

培养基（RZDCu）的9 cm培养皿中，22℃光照培养3~4周（见注49和注51）。

（2）在分化培养基上生长3~4周后，将愈伤组织转移到含有RZ⁺选择培养基的9 cm高盖培养皿上（见注52和注53）［根据转化的质粒所带的选择标记基因选择适合的选择培养基：草胺膦乙酰转移酶基因（*bar*）使用RZPPT4；新霉素磷酸转移酶（nptII）基因使用RZG50（见注11和注12）］。用封口膜封好平皿，放在22℃光照培养（见注49和注54）。

（3）再经过3~4周培养后，将存活的愈伤组织转移到不含激素但有选择试剂的分化培养基（RPPT4或RG50）上，使用9 cm高盖培养皿［见注53和注55，图4.1（d）］。用封口膜封好平皿，放在22℃光照培养（见注49）。

（4）当出现分化的苗并且它能从愈伤中分开时，将它们转到不含激素但有选择试剂的分化培养基上（RPPT4或RG50），使用GA-7 Magenta容器，每个里面不要超过4~6个。放在22℃光照培养（见注49）。

3.4.3 将转基因苗移到土中

（1）当幼苗根系形成并且叶片长到10~15 cm时，将苗移到土中。小心从琼脂中移出幼苗（用水洗掉根部多余的琼脂），然后将幼苗种在8 cm^2 大小的塑料盒中［Nursery Trades,（Lea Valley）Ltd.］。将幼苗放入高湿度的培养箱中1~2周，使它们适应新环境，然后放在温室中生长（见注56和注57）。从基因枪轰击后到幼苗移到土里通常需要3个月时间。

（2）当幼苗长到合适大小（3~4片叶）时，取叶片提取基因组DNA，PCR鉴定是否是转基因植株。若PCR鉴定为阳性，将阳性苗移到13 cm^2 大小的塑料盒［Nursery Trades（Lea Valley）Ltd.］中，同样的温室条件生长（见注57）。植株到成熟需要3~4个月［图4.1（e）］。

（3）分析转基因植物方法很多：使用报告基因表达分析，如β-葡萄糖苷酶（GUS）组织化学检测（46）［图4.1（f）］、紫外条件下观察绿色荧光蛋白（GFP）以及针对草胺膦乙酰转移酶基因（*bar*）使用除草剂涂抹叶片（47）或者氨测试盒（48）。Southern杂交分析和荧光原位杂交（FISH）分析基因整合。

4. 注释

注1：这里所描述的生长条件适合普通小麦 *T. aestivum* 植株的生长，但硬粒小麦 *T. turgidum* ssp. *durum* 需要不同的生长条件。

注2：虽然可使用温室种植的植株，但是由于季节不同，往往个体间存在较大的生长差异。

注3：所有溶液的配制应使用反渗透技术纯化的超纯水，其电阻率达到18.25 MΩ/cm。

注4：针对不同的物种或者小麦品种培养基成分需要适当调整，如基本盐的选择（MS或者L7）、糖（蔗糖或者麦芽糖）的浓度、激素水平等。这些都需要一定的经验。

注5：在添加其他成分前，先溶解 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$。

注6：灭菌的储存液能在4℃保持1~2个月。在储存过程中，一些盐可能会产生沉淀，因此使用前应该充分摇匀。如果没有经过反复冻融，储存液可以至少在-20℃保存一年。

注7：在不同的水合状态下，$MnSO_4$ 所需的质量不同。$MnSO_4 \cdot H_2O$ 需要加17.05 g/L；$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 需要加23.22 g/L；$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 需要加27.95 g/L。

注8：应使用0.2 μm孔径的滤器过滤除菌。大体积使用中空纤维介质过滤器（NBS Biologicals Ltd.，Cambridgeshire，UK）；小体积使用Nalgene针式过滤器（Fisher Scientific UK）。

注9：$AgNO_3$ 用于促进胚胎发育；10 mg/L硫代硫酸银（硝酸银和硫代硫酸钠的混合物）可以替代 $AgNO_3$。$AgNO_3$ 和硫代硫酸银对光敏感，因此储存液以及所配的平皿应避光保存。

注10：硫酸铜是诱导培养试剂（类似于硝酸银），用于促进不定芽的分化。硫酸铜适合的浓度是100 μmol/L（25 mg/L），如果产生的幼苗太多，浓度可以降低到50 μmol/L。

注11：草铵磷是草胺磷结合铵后的合成产物（Greyhound Chromatography and Allied Chemicals，Cheshire，UK），它是除草剂Basta. Bialaphos（phosphinothricylanalylanaline，sodium；Melford Laboratories Ltd.）的活性成分，3~5 mg/L的浓度足够使用。

注12：卡那霉素、巴龙霉素和新霉素等氨基糖苷类抗生素能用于新霉素磷酸转移酶（nptII）基因标记基因选择。虽然它们可能成功用于某些物种，但是由于未转化的小麦组织也具有一定的抗性，因此不建议在小麦中使用这些抗生素。遗传霉素G418可以从Melford Laboratories Ltd. 购买。

注13：琼脂溶液高压灭菌前后应摇匀，以避免凝固不均匀而不利于重新融化。

注14：可以单独添加0.75 g/L L-谷氨酰胺、0.15 g/L L-脯氨酸和0.1 g/L L-天冬酰胺代替使用3AA储存液。

注15：在预培养时蔗糖（9%）浓度会使细胞产生部分细胞质皱缩，这可能会增加细胞承受轰击的能力。但是这只适合一些品种或者物种，而3%的蔗糖往往适合大多数品种，如硬粒小麦 *T. turgidum* ssp. *Durum* 盾片。3%的蔗糖溶液渗透压应在355~398 mOsmol/L内。

注16：2~6 mg/L氨氯吡啶酸（Sigma - Aldrich）可以代替生长素［8，10］。

注17：组织培养基最好尽可能新鲜配制，在培养皿和Magenta容器中的培养基保存时间不要超过2~3周。培养基应该提前几天配好，以便在使用之前能检测是否有污染。融化后使琼脂冷却，大约50℃时倒入平皿以减少平皿中水汽凝结。

注18：选择试剂的使用浓度应能完全抑制非转化的外植体的生长。但是也要根据培养物在每个转换阶段的发育情况选择合适浓度。一般来说，使用浓度为2~6 mg/L草胺膦（PPT）和25~50 mg/L遗传霉素（G418）。

注19：亚精胺容易吸潮和氧化，很难称重。因此，应直接在瓶中用无菌水溶解1 g包装的亚精胺。亚精胺保存时间长了容易脱掉氨基，因此溶液需在-20℃（最好-80℃）

保存，分装的亚精胺一旦经过冻融，不要再使用。

注 20：直径为 0.4～1.2 μm 的贺利氏金粉颗粒（W. C. Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Germany）也成功用于转化。但是伯乐（BIO-RAD）亚微米级金粉颗粒对于小麦转化更稳定。较小一点或者大小均匀的颗粒比较适合较小的小麦细胞，但是对于其他物种，大颗粒可能更适合。

注 21：根据报道发现 650 psi 或 900 psi 的破裂盘最适合小麦品种，450 psi 或 1100 psi的破裂盘虽然能成功转化，但效率较低。也可以选择450 psi、650 psi、900 psi、1100 psi、1350 psi、1550 psi、1800 psi、2000 psi 和 2200 psi 压力的破裂盘。如果是转化新品种或物种，应检测确定合适压力范围的破裂盘。

注 22：质粒往往是以 PUC 为基础改造的，包含 1 个或多个基因簇。为了选择转化的组织，需要一个选择标记基因，如组成型启动子（玉米泛素启动子或者花椰菜花叶病毒 35S 启动子）控制的草胺膦乙酰转移酶基因（*bar*），或者新霉素磷酸转移酶（nptII）基因和合适的终止子（*nos*）。草胺膦乙酰转移酶基因（*bar*）赋予植物对抗除草剂 Basta（草丁膦）和双丙氨磷的能力，新霉素磷酸转移酶（nptII）基因可以抗遗传霉素（G418）、卡那霉素、新霉素、巴龙霉素等（见注 12），报告基因（β-葡萄糖苷酶、萤光素酶或者绿色荧光蛋白）对于检测瞬时和稳定转化非常有用［图 4.1（f）］。这些标记基因可以位于同一质粒，或者位于另外一个共沉淀在金粉颗粒上的质粒。

注 23：在本章介绍的方法已用于很多商业小麦品种的转化，只是转化效率有所不同。Cadenza、Canon 和 Florida 效率最高，最高可达 13%［8,9］。这种方法也成功用于 Ofanto 和 Venusia 这两个硬粒小麦品种 *T. turgidum* ssp. *Durum* 的转化［6,49］。但是对于其他小麦品种，方法需要有所调整［4,5］。

注 24：幼穗可以作为替代的外植体用于转化。幼穗具有很高的分化潜力，对于一些特定的品种，幼穗比幼胚盾片更适合。下面是使用幼穗作为转化材料的文献，包括普通小麦品种 *T. aestivum*［1,8］、硬粒小麦 *T. turgidum* ssp. *Durum*［6,49］、大麦［5］和小大麦 tritiordeum（智利大麦和硬粒小麦品种间杂交获得了可育的双二倍体，含有基因组 $H^{CH}H^{CH}$ AABB）［3,4,16］。

注 25：通常开花后 12～16 天的胚比较合适。可以通过打开一些颖果来确定胚的大小。如果颖果不能一次用完，最好将完好的穗插在水中，保存在 4℃，但是通常不建议这样做。

注 26：避免使用小穗里面的颖果，由于发育不一致，这里面通常包含较小的胚。

注 27：最适合转化的胚的大小为 0.5～1.5 mm；过大或过小的胚，虽然能成功转化但是效率低。胚的大小对瞬时转化并不是最重要的。

注 28：通常情况下，基因枪轰击的金粉颗粒分布在培养皿的中间直径约 2 cm 的圆形区域内。盾片应放置在这个范围内（见瞬时表达的研究［8］所示）。

注 29：在基因枪轰击前，通过预培养阶段让组织从分离过程中恢复，也可预先质壁分离细胞（见注 15）。这也有利于轰击前检测污染。如果是组织不易消毒造成污染，可以在组织培养基中添加 1ml/L 植物防腐剂（PPM）（Plant Cell Technology Inc.，Washington D. C.，USA）。这是一种无毒、广泛使用的广谱防腐剂和杀菌灭藻剂，不影响愈

伤组织的生长或分化。

注 30：超声波处理时，如果金粉颗粒悬浮在液体中，而不是沉淀在管底，效果更好。有证据表明，过度超声会造成聚合，所以超声时间不应该超过 1~2 min。

注 31：如果轰击数很少或者需要比较不同 DNA 量的差异，金粉悬浮物可以进一步分装并且体积需要相应减少。

注 32：如果质粒浓度不是 1 mg/ml，计算 5 μg DNA 所需体积加入到金粉中。最好 DNA 溶液体积不要太大，如果 DNA 浓度很低，重新浓缩 DNA。

注 33：为了检测基因枪轰击后的分化和选择效率，需要对照平皿（见注 40）。应准备一些无 DNA 的金粉悬浮液，可以用无菌水代替 DNA。

注 34：50μl 金粉悬浮液中标准 DNA 的使用量是 5 μg。如果使用超过一种质粒，如共轰击，计算等摩尔数质粒 DNA 所需添加的量，两个质粒一共 5 μg DNA（大于 5 μg，可能会导致颗粒结块）。另外，目标基因质粒与选择标记质粒比例可以有所不同，例如，将目标基因质粒与选择标记质粒比例调成 1.5∶1；选择到的植株中同时含有选择标记基因和目标基因的可能性会增加。

注 35：$CaCl_2$ 和亚精胺法主要起结合、稳定和沉淀 DNA 的作用。其沉淀在金粉颗粒的速度很快，所以 $CaCl_2$ 和亚精胺应预先混合，才能尽可能均匀地包被金粉。

注 36：在这个阶段金粉必须完全悬浮，否则以后悬浮步骤也不能消除结块金粉。通过使用吸管头刮擦离心管壁和反复吹打消除结块，使金粉尽可能重悬。涡旋起不到增加悬浮的作用。

注 37：金粉-DNA 悬浮液应尽快使用；不过这一步可放在冰上（不超过 1 h），其他操作应在此步之前完成。

注 38：在这一步应注意避免挥发太多，由于乙醇挥发将增加最终金粉颗粒悬浮物浓度。尽管 85 μl 的体积够 16~17 次轰击（5 μl/shot），但是除去自然挥发，85 μl 的终体积将只够 10~12 次轰击。为了减少使用前乙醇的挥发，用封口膜封住离心管管盖。最好还是尽快使用包埋好的金粉颗粒。

注 39：农杆菌介导转化小麦是一个可行的、替代的转化体系。转化方法在别处有报道［47,50,51］。

注 40：在每个实验中应包括各种对照：未轰击的对照用于检测供体组织的生长和分化；不含 DNA 的金粉轰击后不经过选择用于检测轰击后组织培养响应；不含 DNA 的金粉轰击后经过选择以检测选择和分化的效果。

注 41：虽然这些设定对经常使用的小麦品种进行过优化，但是对不同品种或物种需要进行调整。

注 42：破裂盘是由多层膜组成，因此灭菌时间不应该超过 10 min，否则多层膜会分离。

注 43：当包被好的金粉颗粒滴在载体膜上，乙醇应缓慢挥发干。超净台可能会造成震动，使金粉颗粒结块。所以为了使干的颗粒完全均匀分布在载体膜上，将载体膜放在无菌的培养皿中，移到超净台外面置于平台以防震动。每次最好少涂几个载体膜，当载体膜干后尽快使用。轰击前，应用显微镜检查载体膜观察金粉颗粒是否均匀分布，丢

弃有结块金粉的，否则将降低转化效率。

注44：气缸中的氦气压力应设置比预期的破裂盘压力大约高200 psi。

注45：氦气压力积累直到破裂盘破裂，推动载体膜到终止屏，从而释放和分散金粉颗粒。应该检测破裂盘破裂所需要的实际压力，确保轰击成功，否则会影响转化效率。

注46：轰击后，显微镜下观察载体膜上终止屏留下的网格。这可以看到释放/保留金粉颗粒的多少。

注47：使用后，应使用超声波处理载体膜和终止屏，破坏上面附着的DNA，防止对下次轰击造成污染。

注48：盾片应分布均匀，减少培养密度，防止竞争养分。

注49：在可以控制环境温度的培养室培养，12 h光照，光源是日光灯，光强大约是250 μmol/（m^2·s）PAR。温度设定在22℃光照培养。托盘铺上铝箔，在愈伤组织诱导阶段保持黑暗。

注50：瞬时表达实验，如β-葡萄糖苷酶组织化学检测根据构建的质粒不同可以在转化后1~3天进行，如分析启动子强弱。

注51：在这个阶段，转移整个愈伤，不需分成小块，大约每皿放置10个愈伤组织。

注52：诱导体细胞胚胎形成一般需要3~5周。应定期检查外植体是否有污染。判断转移到分化培养基的最佳发育阶段需要有一定的经验。转移有成熟的体细胞胚的胚性愈伤组织，包括一些可能正在形成幼苗的。

注53：使用另一个培养皿底翻过来作为盖子盖上，形成"高盖"。这给幼苗的生长增加了一定的高度。

注54：选择一般是在第二次以及后续的转移中进行，一直到所有对照植株死亡（见注40）。但是也可以提前选择，如在诱导愈伤时或者在第一轮分化时。如果它们在早期选择时比较弱，这可能会减少愈伤组织和/或植株幸存的数量，导致转化的损失。

注55：如果分化的愈伤组织转移时比较大，应减少9 cm培养皿中的愈伤组织数量以防止过度拥挤。必要时愈伤组织可以分开，但是每个愈伤碎片应根据来源标记上，以便尽可能追踪植株的克隆来源。

注56：组织培养试管苗很少或根本没有蜡质角质层，转移到土壤后特别容易干，所以在角质层形成前应保持湿度。

注57：温室条件应设置为白天18~20℃、夜晚14~16℃，16 h光照。光源使用自然光，另外补充金属钠灯（Osram Ltd.）。光强为400~1000 μmol/（m^2·s）PAR。

致谢

感谢英国生物学与生物技术委员会对洛桑研究所的经费支持！感谢洛桑研究所作物转化中心的研究人员对本文涉及的各种方法的建立所做的贡献！

（徐 恒 朱 英 译）

参考文献

1. Rasco-Gaunt, S. and Barcelo, P. (1999) Immature inflorescence culture of cereals: a highly responsive system for regeneration and transformation, in *Methods in Molecular Biology-Plant Cell Culture Protocols* (Hall, R., ed.), Humana, Totowa, pp. 71-81.
2. Sparks, C. A., Castleden, C. K., West, J., Habash, D. Z., Madgwick, P. J., Paul, M. J., Noctor, G., Harrison, J., Wu, R., Wilkinson, J., Quick, W. P., Parry, M. A. J., Foyer, C. H. and Miflin, B. J. (2001) Potential for manipulating carbon metabolism in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 138, 33-45.
3. Barcelo, P., Hagel, C., Becker, D., Martin, and Lorz, H. (1994) Transgenic cereal (Tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *Plant J.* 5, 583-592.
4. Barcelo, P. and Lazzeri, P. (1995) Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues, in *Methods in Molecular Biology Plant Gene Transfer and Expression Protocols*, (Jones, H., ed.), Humana, Totowa, pp. 113-123.
5. Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P. A. and Barcelo, P. (1999) Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica* 108, 161-167.
6. He, G. Y. and Lazzeri, P. A. (2001) Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum Desf.*) *scutellum and inflorescence cultures. Euphytica* 119, 369-376.
7. He, G. Y., Lazzeri, P. A. and Cannell, M. E. (2001) Fertile transgenic plants obtained from tritordeum inflorescences by tissue electroporation. *Plant Cell Rep.* 20, 67-72.
8. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (1999) Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep.* 19, 118-127.
9. Rasco-Gaunt, S. Riley, A. Cannell, M. Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 52, 865-874.
10. Barro, F., Cannell, M. E., Lazzeri, P. A. and Barcelo, P. (1998) The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theor. Appl. Genet.* 97 684-695.
11. He, G. Y. and Lazzeri, P. A. (1998) Analysis and optimisation of DNA delivery into wheat scutellum and tritordeum inflorescence explants by tissue electroporation. *Plant Cell Rep.* 18, 64-70.
12. Pastori, G. M., Wilkinson, M. D., Steele, S. H., Sparks, C. A., Jones, H. D. and Parry, M. A. J. (2001) Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *J. Exp. Bot.* 52, 857-863.
13. Goodwin, J., Pastori, G., Davey, M. and Jones, H. D. (2005) Selectable markers: antibiotic and herbicide resistance, in *Transgenic Plants-Methods and rotocols*, (Pena, L., ed.), Humana, Totowa.
14. Sparks, C. A. and Jones, H. D. (2004) Transformation of wheat by biolistics, in *Transgenic Crops of the World-Essential Protocols* (Curtis, I. P., ed.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 19-35.
15. He, G. Y., Rooke, L., Steele, S., Bekes, F., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R., Barcelo, P., Shewry, P. R. and Lazzeri, P. A. (1999) Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) with high-molecularweight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Mol. Breed.*

5, 377-386.

16. Barcelo, P., Vazquez, A. and Martin, A. (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration from Tritordeum. *Plant Breed.* 103, 235-240.
17. Blechl, A. E. and Anderson, O. D. (1996) Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nat. Biotechnol.* 14, 875-879.
18. Vasil, I. K. and Anderson, O. D. (1997) Genetic engineering of wheat gluten. *Trends Plant Sci.* 2, 292-297.
19. He, G. Y., Jones, H. D., D' Ovidio, R., Masci, S., Chen, M. J., West, J., Butow, B., Anderson, O. D., Lazzeri, P., Fido, R. and Shewry, P. R. (2005) Expression of an extended HMW subunit in transgenic wheat and the effect on dough mixing properties. *J. Cereal Sci.* 42, 225-231.
20. Barro, F., Rooke, L., Bekes, F., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R., Lazzeri, P. A., Shewry, P. R. and Barcelo, P. (1997) Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotechnol.* 15, 1295-1299.
21. Rooke, L., Barro, F., Tatham, A. S., Fido, R., Steele, S., Bekes, F., Gras, P., Martin, A., Lazzeri, P. A., Shewry, P. R. and Barcelo, P. (1999) Altered functional properties of tritordeum by transformation with HMW glutenin subunit genes. *Theor. Appl. Genet.* 99, 851-858.
22. Rooke, L., Bekes, F., Fido, R., Barro, F., Gras, P., Tatham, A. S., Barcelo, P., Lazzeri, P. and Shewry, P. R. (1999) Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J. Cereal Sci.* 30, 115-120.
23. Alvarez, M. L., Guelman, S., Halford, N. G., Lustig, S., Reggiardo, M. I., Ryabushkina, N., Shewry, P. R., Stein, J. and Vallejos, R. H. (2000) Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theor. Appl. Genet.* 100, 319-327.
24. He, G. Y., D' Ovidio, R., Anderson, O. D., Fido, R., Tatham, A. S., Jones, H. D., Lazzeri, P. and Shewry, P. R. (2000) Modification of storage protein composition in transgenic bread wheat, in *Wheat Gluten*, (Shewry, P. R. and Tatham, A. S., eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge.
25. Tosi, P., Napier, J. A., D' Ovidio, R., Jones, H. D. and Shewry, P. R. (2000) Modification of the LMW glutenin subunit composition of durum wheat by microprojectile-mediated transformation, in *Wheat Gluten*, (Shewry, P. R. and Tatham, A. S., eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 93-96.
26. Barro, F., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Shewry, P. R., Martin, A. and Ballesteros, J. (2002) Field evaluation and agronomic performance of transgenic wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105, 980-984.
27. Darlington, H., Fido, R., Tatham, A. S., Jones, H. D., Salmon, S. E. and Shewry, P. R. (2003) Milling and baking properties of field grown wheat expressing HMW subunit transgenes. *J. Cereal Sci.* 38, 301-306.
28. Barro, F., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Shewry, P. R., Ballesteros, J. and Martin, A. (2003) Functional properties of flours from field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunit 1Ax1 and IDx5 genes. *Mol. Breed.* 12, 223-229.
29. Tosi, P., D' Ovidio, R., Napier, J. A., Bekes, F. and Shewry, P. R. (2004) Expression of epitope-tagged LMW glutenin subunits in the starchy endosperm of transgenic wheat and their incorporation into glutenin polymers. *Theor. Appl. Genet.* 108, 468-476.
30. He, G. Y. Jones, H. D., D' Ovidio, R., Masci, S., Chen, M., West, J., Butow, B., Anderson, O. D., Lazzeri, P., Fido, R. and Shewry, P. R. (2005) Expression of an extended HMW

subunit in transgenic wheat and the effect on dough mixing properties. *J. Cereal Sci.* 42, 225-231.

31. Popineau, Y., Deshayes, G., Lefebvre, J., Fido, R., Tatham, A. S. and Shewry, P. R. (2001) Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines expressing 1Ax and 1Dx high molecular weight glutenin subunit trans-genes. *J. Agr. Food Chem.* 49, 395-401.
32. Shewry, P. R., Halford, N. G., Tatham, A. S., Popineau, Y., Lafiandra, D. and Belton, P. S. (2003) The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Adv. Food Nutr. Res.* 45, 219-302.
33. Meyer, F. D., Talbert, L. E., Martin, J. M., Lanning, S. P., Greene, T. W. and Giroux, M. J. (2007) Field evaluation of transgenic wheat expressing a modified ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit. *Crop Sci.* 47, 336-342.
34. Kluth, A., Sprunck, S., Becker, D., Lorz, H. and Lutticke, S. (2002) 5 ' deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. *Plant Mol. Biol.* 49, 669-682.
35. Smidansky, E. D., Clancy, M., Meyer, F. D., Lanning, S. P., Blake, N. K., Talbert, L. E. and Giroux, M. J. (2002) Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *P. N. A. S. USA* 99, 1724-1729.
36. Baga, M., Repellin, A., Demeke, T., Caswell, K., Leung, N., Abdel-Aal, E. S., Hucl, P. and Chibbar, R. N. (1999) Wheat starch modification through biotechnology. *Starch-Starke* 51, 111-116.
37. Hogg, A. C., Beecher, B., Martin, J. M., Meyer, F., Talbert, L., Lanning, S. and Giroux, M. J. (2005) Hard wheat milling and bread baking traits affected by the seed-specific overexpression of puroindolines. *Crop Sci.* 45, 871-878.
38. Beecher, B., Bettge, A., Smidansky, E. and Giroux, M. J. (2002) Expression of wild-type pinB sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype. *Theor. Appl. Genet.* 105, 870-877.
39. Krishnamurthy, K. and Giroux, M. J. (2001) Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nat. Biotechnol.* 19, 162-166.
40. McKibbin, R. S., Wilkinson, M. D., Bailey, P. C., Flintham, J. E., Andrew, L. M., Lazzeri, P. A., Gale, M. D., Lenton, J. R. and Holdsworth, M. J. (2002) Transcripts of Vp-1 homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *P. N. A. S. USA* 99, 10203-10208.
41. Stoger, E., Williams, S., Keen, D. and Christou, P. (1999) Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. *Transgen. Res.* 8, 73-82.
42. Rasco-Gaunt, S., Liu, D., Li, C. P., Doherty, A., Hagemann, K., Riley, A., Thompson, T., Brunkan, C., Mitchell, M., Lowe, K., Krebbers, E., Lazzeri, P., Jayne, S. and Rice, D. (2003) Characterisation of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. *Plant Cell Rep.* 21, 569-576.
43. Hauptmann, R. M., Ashraf, M., Vasil, V., Hannah, L. C., Vasil, I. K. and Ferl, R. (1988) Promoter strength comparisons of maize shrunken-1 and alcohol dehydrogenase-1 and dehydrogenase-2 promoters in monocotyledonous and dicotyledonous species. *Plant Physiol.* 88, 1063-1066.
44. Chamberlain, D. A., Brettell, R. I. S., Last, D. I., Witrzens, B., McElroy, D., Dolferus, R. and Dennis, E. S. (1994) The use of the Emu promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 21, 95-112.
45. Jones, H. D. (2005) Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J. Cereal Sci.* 41, 137-147.

46. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) Beta-glucuronidase (Gus) as a sensitive and versatile gene fusion marker in plants. *J. Cell. Biochem.* 13, 3901-3907.
47. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B. and Jones, H. D. (2003) Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 21, 659-668.
48. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Lazzeri, P. and Barcelo, P. (1999) A facile method for screening for phosphinothricin (PPT) -resistant transgenic wheats. *Mol. Breed.* 5, 255-262.
49. Lamacchia, C., Shewry, P. R., Di Fonzo, N., Forsyth, J. L., Harris, N., Lazzeri, P. A., Napier, J. A., Halford, N. G. and Barcelo, P. (2001) Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *J. Exp. Bot.* 52, 243-250.
50. Jones, H. D., Doherty, A. and Wu, H. (2005) Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Trends Plant Sci.* 1, 5.
51. Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C. and Jones, H. D. (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *J. Exp. Bot.* 52, 1135-1142.

第5章　农杆菌介导的小麦新鲜离体幼胚的转化

Huixia Wu　Angela Doherty　Huw D. Jones

摘　要：农杆菌介导法是继传统基因枪法后另一种可行的小麦遗传转化方法。它具有操作简单、整合拷贝数低等优点，且对特定的硬粒小麦、春性及冬性面包小麦等品种具有同等转化效率。

关键词：根癌农杆菌，面包小麦，硬粒小麦，AGL1，接种，幼胚

1. 前言

根癌农杆菌是已知唯一一类先天具有将基因转移到植物体内能力的原核生物，尽管最近的研究显示，其他属细菌通过导入 Ti 质粒也能获得这种能力［1］。20 世纪 80 年代后期，人们利用农杆菌对一些双子叶植物进行遗传转化获得成功，但当时认为禾谷类作物是一类顽固的、不轻易被根癌农杆菌侵染的作物，因此，直接 DNA 转移的物理方法仍然是当时基因工程转化的唯一途径（见第 1 章）。然而，随着农杆菌介导转化法在双子叶植物转化中表现出的优点，尤其是操作简单及 T-DNA 整合拷贝数低等特点，极大地推动了禾谷类作物农杆菌介导转化法的研究。20 世纪 90 年代，相继报道了农杆菌介导的水稻、玉米、春性小麦和大麦的遗传转基因整合。如今，除燕麦和粟外，其他主要的禾谷类作物均有采用农杆菌介导转化成功的报道。

相对来说，采用农杆菌介导法成功转化的小麦基因型很少，且几乎都是春性小麦（综述［2］）。尽管胚性愈伤作为外植体已成功用于小麦的遗传转化，但转化时普遍使用的还是幼胚。本操作中选用刚分离出的、长 0.8~1.5 mm 的幼胚作为转化的外植体，转化时将幼胚与携有 pGreen 的双元载体和 pSoup 辅助质粒（含有 *vir* 基因［4~6］）的农杆菌菌株 AGL1［3］共培养。该方法从侵染至转化苗入土整个流程约需 13 周，并已成功应用于春性和冬性面包小麦及 1 例硬粒小麦品种［2,4,7］。以得到的 PCR 阳性转化株总数与所用的幼胚数之比计算转化效率，我们实验室的转化效率为 0.3%~9%。

2. 试验材料

2.1　植物供体材料

（1）对于冬性面包小麦品种，需在 4~5℃下对种子进行春化处理。光照条件为 70 W荧光灯每天光照 12 h，架子表面光照强度约 150 μ mol/(m^2·s)。处理 8 周后，将

幼苗转移至可控制生长室，生长条件详见下面叙述。

（2）对于春性小麦品种，种子可直接播入直径 21 cm、装有 Rothamsted 混合堆肥（详见［8］）的盆里，所有的盆置于可控条件下。昼/夜温度为 18~20℃/14~15℃，湿度 50%～70%，光照条件为 400 W 石英碘灯每天光照 16 h。盆表面光照强度为 700 μmol/(m^2·s)光合有效辐射。初期采用人工顶部浇水，待长出根后，则改用自动供水系统浇水。为了防止材料感染白粉病等真菌病害，在播种后 4~6 周应进行一次预防性喷药。

（3）硬粒小麦的生长条件见注 1。种子在 4℃春化处理 3 周后（春化条件同面包小麦），将幼苗转移至配备有自动遮阴系统、灌溉系统、侧部和顶部有通风口的玻璃房隔室（Envirocon）培养。昼/夜的温度保持在 20~25℃/16~18℃，光周期为 16 h/8 h。材料自始至终人工浇水，春化结束后 4~5 周进行预防性喷药。

2.2 用标准甘油法保存根癌农杆菌

（1）用划线法将农杆菌接种于 LB 培养基，培养基为 15 g/L 细菌用琼脂加相应抗生素（表 5.1），28℃暗培养 2~3 天至单菌落群清晰可见（见注 2）。

（2）用牙签或枪头挑取单菌落，将其接入 50 ml 的一次性离心管中，离心管中事先加 10 ml LB 液体培养基（表 5.1）并添加相应抗生素。28℃条件下，250 r/min 暗培养至悬浮菌液混浊，光密度（OD）>1.0（A_{600}）。

表 5.1　二倍浓度培养基成分（除调节 pH 和灭菌后添加的物质是终浓度外，其他所有的成分均为二倍浓度）

成分	接种/共培养/L^{-1}	诱导 a /L^{-1}	诱导 b /L^{-1}	再生 /L^{-1}	选择 1 /L^{-1}	选择 2 /L^{-1}
MS 大量元素（10×）/ml	200	200	200	—	—	—
L7 大量元素（10×）/ml				200	200	200
L7 微量元素（1000×）/ml	2	2	2	2	2	2
FeNaEDTA（100×）/ml	20	20	20	20	20	20
MS 维生素（1000×）/ml	2	2	2	—	—	—
维生素/肌醇（200×）/ml	—	—	—	10	10	10
肌醇/mg	200	200	200	200	200	200
谷氨酰胺/mg	1000	1000	750	—	—	—
脯氨酸/mg	—	—	150	—	—	—
天冬酰胺/mg	—	—	100	—	—	—
水解酪蛋白/mg	200	200	—	—	—	—
缓冲剂/g	3.9	3.9	—	—	—	—
葡萄糖/g	20	—	—	—	—	—
麦芽糖/g	80	80	—	60	60	60
蔗糖/g	—	—	90	—	—	—

续表

成分	接种/共培养/L^{-1}	诱导 a /L^{-1}	诱导 b /L^{-1}	再生 /L^{-1}	选择 1 /L^{-1}	选择 2 /L^{-1}
调节 pH 至 5.7 后过滤灭菌 2,4-D/mg	2	0.5	—	0.1	—	—
氨氯吡啶酸/mg	2.0	2.0	—	—	—	—
乙酰丁香酮/(μmol/L)	200	—	—	—	—	—
特美汀/mg	—	160	160	160	160	160
玉米素/mg	—	—	—	5	—	—
草甘膦/mg	—	—	—	—	2.5	2.5

（3）菌液 4500 *g* 离心 5 min。用灭过菌的 10 mmol/L $MgSO_4$ 1 ml 重悬菌体沉淀后，再与 3 ml 的 80% 无菌甘油混合。每支无菌冷冻管分装 400 μl，放置于−80℃长期保存（见注 3）。

（4）如果是短期保存，同上述步骤 3 的方法一样培养单菌落，但只需将单菌落接种于含有 3.5 ml 液体培养基的 15 ml 一次性离心管即可。分装时每支无菌冷冻管中加入 200 μl 菌液与 200 μl 30% 的无菌甘油混合，混合后的菌液可以在−20℃保存 1~2 个月或置于−80℃长期保存。

2.3　操作中使用的培养基

LB 培养基［9］：蛋白胨 5 g/L，酵母提取物 5 g/L，NaCl 10 g/L，双蒸水定容，根据需要调 pH 至 7.0，高压锅灭菌。

MG/L 培养基［10］：甘露醇 5 g/L，L-谷氨酸 1 g/L，KH_2PO_4 250 mg/L，NaCl 100 mg/L，$MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 100 mg/L，胰蛋白胨 5 g/L，酵母提取物 2.5 g/L，根据需要调 pH 至 7.0。高压锅灭菌后每升添加 1 μg 的生物素。

2.3.1　植物组织培养培养基

该操作中所有的植物组织培养培养基的配方见表 5.1。这些培养基包括侵染培养基/共培养培养基（液体/固体）、适用于面包小麦的诱导培养基 a、适用于硬粒小麦的诱导培养基 b、第一轮选择培养基 1 和第二轮选择培养基 2。

2.4　培养基的准备

为了使不同种类的培养基中胶凝剂的量相等，所有的植物培养基配制为二倍浓度原液。二倍浓度的固体接种（共培养）培养基、诱导培养基 a 以及诱导培养基 b 中植物凝胶的浓度是 4 g/L，而再生培养基、选择培养基 1 及选择培养基 2 则可用琼脂胶（10 g/L）替代植物凝胶。

第 3.1 节中用于重悬农杆菌的是一倍浓度的液体接种培养基。因此，使用前应先向二倍浓度的侵染培养基中加入等体积的无菌双蒸水。

2.5 基础培养基母液成分（根据参考文献［8］修改）

· MS 大量元素（10×）：NH_4NO_3 16.5 g/L，KNO_3 19.0 g/L，KH_2PO_4 1.7 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.7 g/L，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4.4 g/L。用蒸馏水分别完全溶解以上各成分，再将所有的成分混溶。灭菌锅 121℃灭菌 20 min，4℃储存。

· L7 大量元素（10×）：NH_4NO_3 2.5 g/L，KNO_3 15.0 g/L，KH_2PO_4 2.0 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.5 g/L，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4.5 g/L。用蒸馏水分别溶解以上各成分，再将所有的成分混溶。灭菌锅 121℃灭菌 20 min，4℃储存。

· L7 微量元素（1000×）：$MnSO_4$ 15.0 g/L，$H_3BO_3$5.0 g/L，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.5 g/L，KI 0.75 g/L，$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.25 g/L，$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.025 g/L，$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025 g/L。每次制备 100 ml 的微量元素原液，过滤除菌后 4℃储存。

· MS 维生素（甘氨酸）（1000×）：盐酸硫胺素 0.1 g/L，盐酸吡哆醇 0.5 g/L，烟酸 0.5 g/L。每次制备 100 ml，过滤除菌后 4℃储存。

· 维生素/肌醇（200×）：肌醇 40.0 g/L，盐酸硫胺素 2.0 g/L，盐酸吡哆醇 0.2 g/L，烟酸 0.2 g/L，泛酸钙 0.2 g/L，抗坏血酸 0.2 g/L。过滤除菌后等量分装成 10 ml并放置于-20℃储存。

2.6 其他成分

· 乙酰丁香酮（3′,5′-二甲氧基-4′-羟基苯乙酮）：用 70% 乙醇充分溶解配成 10 mg/ml或 50 mmol/L 的原液。过滤除菌，分装后置于-20℃储存。

· 2,4-二氯苯氧乙酸（2，4-D）：用乙醇/水溶解配制成 1 mg/ml（粉末用乙醇充分溶解后加水定容）。过滤除菌后再分装成 1 ml/管并置于-20℃储存。

· 玉米素（10 mg/ml）：用少量的 1 mol/L HCl 将粉末溶解，再加水定容并涡旋混匀。过滤除菌后再分装成 1 ml/管并置于-20℃储存。

· 氨氯吡啶酸（1 mg/ml）：用水溶解后，过滤除菌，再分装成 2 ml/管并置于-20℃储存。

· 特美汀（300 mg/ml）：用水溶解特美汀［替卡西林钠/克拉维酸（15：1）］。过滤除菌后再分装成 1 ml/管并置于-20℃储存。

· 草铵膦（PPT）（10 mg/ml）：用水溶解并涡旋混匀。过滤除菌后再分装成 1 ml/管并置于-20℃储存。

· Silwet L-77（1%，*V/V*）：溶于水后，过滤除菌，再等样分装成 0.5 ml 并置于 4℃储存。

· 生物素（1 mg/100 ml）：溶于水后，过滤除菌，再等样分装成 0.5ml 并置于-20℃储存（使用时 1 L MG/L 培养基中添加 100 μl）。

3. 试验方法

3.1 根癌农杆菌菌液的准备

（1）从根癌农杆菌甘油原液中吸取 400 μl 加入含 10 ml MG/L 液体培养基并添加相

应抗生素的 50 ml 无菌管中，28℃、250 r/min 摇床振荡培养过夜（17~20 h）至 OD_{600nm} = 1.0~1.5。

（2）农杆菌细胞在 4500 *g* 下离心 10 min 后，弃上清（见注 4），用 4 ml 的 1×侵染培养基重悬农杆菌细胞（见表 5.1）。

（3）将重悬后含农杆菌的侵染培养基置于 50 ml 无菌管中，28℃黑暗条件下摇床中振荡培养 1~3 h（见注 5）。

3.2 根癌农杆菌接种外植体的准备（见注 6）

（1）面包小麦和硬粒小麦开花后 12~16 天剪下幼穗，将种子幼体用 70%（*V/V*）的乙醇浸泡 1 min，再换用 10% 乙醇（*V/V*）轻轻晃动 10 min 进行表面消毒，最后用足量的灭菌蒸馏水冲洗三次以上（见注 7）。

（2）在层流罩超净台上，借助体视显微镜从种子幼体中分离出幼胚（见注 8）。用锋利的手术刀除去胚轴。

（3）将幼胚盾片朝上接入直径 55-mm 或 60-mm、盛有侵染培养基（表 5.1）的培养皿，以确保盾片与农杆菌细胞充分接触，与 3.3 节的步骤 2 衔接。为防止添加农杆菌菌液时幼胚漂浮，要确保幼胚同培养基接触良好，每皿最佳约接 50 个幼胚。

3.3 幼胚的接种

（1）幼胚盾片接种于侵染培养基后，从摇床上取出一管菌液（见注 9），向管中加入 60 μl 1%（*V/V*）的 Silwet，至终浓度为 0.015%。

（2）完成 3.2 节的步骤 3 后，立即将离心管中所有的农杆菌菌液（4 ml）倒入已接种幼胚盾片的培养皿中［见注 10，图 5.1（a）］。

（3）将培养皿转移至黑暗条件下放置 15 min 至 3 h（见注 11）。在此期间可以进行其他培养皿的农杆菌菌液侵染操作。

（4）吸去多余的农杆菌悬液［图 5.1（b）］，应注意不要吸到胚（见注 12）。将胚转移至含固体接种培养基的新培养皿中，接种时盾片向上，胚轴面需接触到培养基。

（5）将共培养培养板置于 22~23℃暗培养 2~3 天。

3.4 胚性愈伤的诱导和再生

（1）共培养 2~3 天后，将胚转移至诱导培养基以诱导胚性愈伤（表 5.1，诱导培养基 a 适用于面包小麦，诱导培养基 b 适用于硬粒小麦）。记录下转移的胚的个数以便计算转化效率，转移时确保胚的盾片仍朝上。22~23℃避光培养。

（2）3~4 周后，再将胚性愈伤组织转移至再生培养基（表 5.1），12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养 3~4 周（见注 13）。

3.5 选择（见注 14）

（1）将培养物转移至第一轮选择培养基中（表 5.1，选择培养基 1）（见注 15）。一些愈伤组织在转移时会自然散开，尽管这无关紧要，但放置时应将散开的愈伤块彼此靠

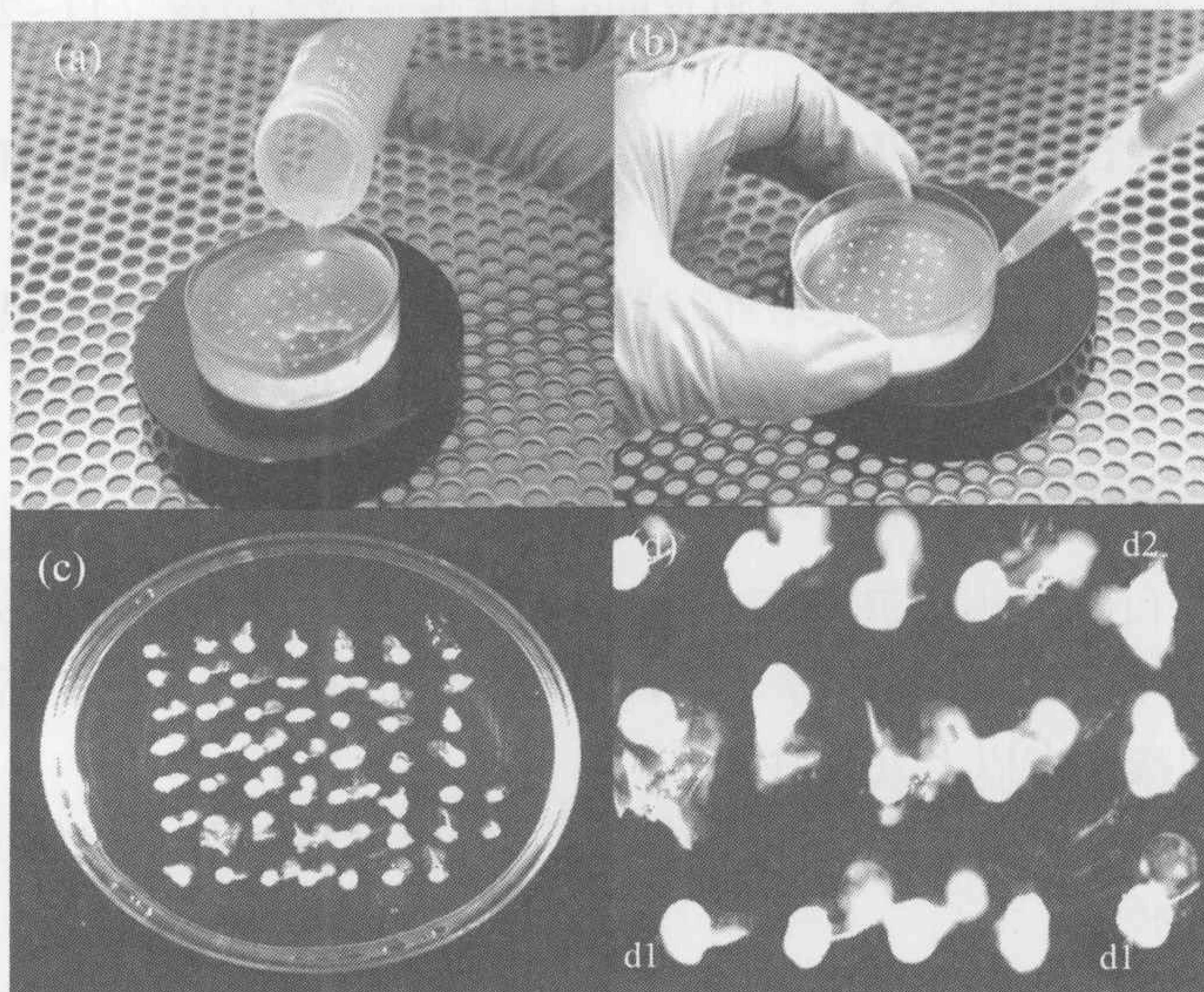


图 5.1　(a) 将农杆菌菌液沿着培养皿的边沿缓慢倒入以防止幼胚漂浮。(b) 显示将培养板稍稍倾斜且注意不要碰到幼胚，将菌液尽可能吸除。(c) 共培养 3 天后的培养板。(d) 胚胎特写显示农杆菌的生长水平。d1，可能会健康发育的幼胚；d2，农杆菌过度生长的幼胚，农杆菌过度生长会妨碍正常胚性愈伤的发育

近，以标记它们是来自同一幼胚。

(2) 培养 3 或 4 周后，筛选出有芽或有根的愈伤组织并将其转入第二轮选择培养基（表 5.1，选择培养基 2）。此时，愈伤组织已足够大，可以置于 Magenta 培养盒中。与上述的操作一样，来自同一愈伤组织的部分仍放在一起。

3.6　转基因植株的鉴定及种子的收获

(1) 经第二轮选择后，挑出根茎生长良好的再生苗（见注 16）移栽于土壤中。首先，将各株再生苗移入 8 cm^2 的盆钵里生长 1~2 周，使它们能够逐渐适应温室条件。当小苗足够大时，再取叶片提取 DNA 用于 PCR 和 Southern 杂交分析（见注 17）。

(2) 对于冬性小麦品种，装有待定的转基因植株的 Magenta 盒应置于春化室（条件见 2.1 节），6~8 周后，再采用上述相同的方法移栽入土壤中。

(3) 已确定的转基因苗应分单株移入直径 13 cm 的盆钵中种植，直至成熟并收获种子。

3.7　转化效率的计算

(1) 转化效率通常用百分比表示。计算方法为：确定的独立转基因单株总数×100/侵染的总幼胚数。

(2) 如果一个胚得到一株以上的转基因植株，这视为一个独立转化事件，来自同

一转化事件的其他所有单株视为姐妹株。这些姐妹株有可能来源于不同的细胞，属于独立转化事件，但只有通过 Southern 杂交分析才能加以确定。所以此法有可能低估了某些转基因实验的转化效率。

4. 注释

注 1：同春性小麦一样，多数硬粒小麦品种无需春化处理，但在可控条件下或温室内，硬粒小麦生长的最佳温度范围与面包小麦不同，所以要区分对待。

注 2：使用哪种抗生素取决于农杆菌菌株的选择标记以及所用的双元载体。对本操作中所用的 AGL1 菌株而言，使用羧苄青霉素（200 mg/l）。对于双元载体 pAL154/pAL156 或 pAL155/pAL156，由于 pAL156 含有卡那霉素选择标记，所以用卡那霉素（100 mg/l）进行筛选［2,7］。

注 3：理想情况下，在放入-80℃冻存前，菌液与甘油混合液应先在液氮中速冻。

注 4：上清液应是清澈的，且菌液颗粒应呈奶油状；如若不是，说明菌液可能培养过了。

注 5：3 h 不是侵染的最长极限；侵染时间最长可达 8 h。侵染时间超过 3 h 可获得转化植株，但农杆菌会呈现块状。

注 6：一般准备两个对照培养皿。干对照是用与试验组完全相同的方式处理胚，但不进行侵染操作。湿对照也是用与试验组完全相同的方式处理胚，但用添加 Silwet 而无农杆菌细胞的 1×侵染培养基进行侵染。设置这两个对照是为了监测幼胚、液体培养基和固体培养基的质量。

注 7：从麦穗上取下的未成熟种子可储存于 4℃过夜，应注意防止种子干燥失水。经表面消毒后，种子保存的时间不能超过几个小时。幼胚应选择长 0.8~1.5mm、外观白色半透明的，如果呈奶油色说明胚太老了。

注 8：重悬后的菌管使用前需放在摇床上至少振荡 30 min。

注 9：当胚浸没在农杆菌悬浮液中时，大部分的胚将保持同培养基的良好接触。如果一些胚漂浮起来，稍稍用力将其浸没，因为盾片表面必须与农杆菌菌液接触。

注 10：可以在培养板上覆盖一层蓝色卷布或铝箔以避光。侵染的时间比较严格。理论上，15 min 可能足以使 T-DNA 转移，但这可能不适合本实验。因此，如果有必要的话，适当延长侵染时间可能更适合本实验的操作。但要注意，长时间的潮湿和农杆菌过度生长对胚有损伤（见注 12）。

注 11：切记胚不可太潮湿；转移前尽可能地吸去农杆菌悬浮液，但不能用滤纸吸干胚。这一步至关重要，值得多花点时间，因为共培养阶段农杆菌的过度生长会损伤胚。

注 12：一些受损严重、在诱导阶段无任何生长迹象的胚，此时可以将其移除，但应做好记录。

注 13：由于双元载体上有 *bar* 基因作为选择标记基因，所以此处培养基中添加草甘膦（PPT）作为筛选剂。

注 14：由于大多数的胚性愈伤组织分化出芽和一些根，因此将根完全插入选择培养基里很重要。这样处理会降低逃逸的风险（如非转基因再生植株的形成）。这个阶段要采用双底层培养皿（培养皿的底部作为盖子）使芽有更多正常生长的空间。

注 15：如果再生苗第一片叶片生长不健壮，表明此再生苗不耐受选择压。通常情况下，如果再生苗长出强壮的根且能深深扎入选择培养基中，表明其可能是转基因苗。

注 16：在此阶段，如果再生苗足够强壮，可取叶片进行 DNA 的提取和 PCR 反应，尽早确定是否为转基因植株。若双元载体中含有 *gusA* 基因，则可取一小片叶片做 GUS 活性测定［4,11］。

致谢

洛桑实验站获得英国生物技术和生物科学研究委员会（BBSRC）的资助。国际玉米小麦改良中心小麦遗传转化方面的研究获得欧洲委员会、日本政府和分子植物育种合作研究中心的资助。

（张礼霞　范宏环　译）

参考文献

1. Broothaerts，W.，Mitchell，H. J.，Weir，B.，Kaines，S.，Smith，L. M. A.，Yang，W.，Mayer，J. E.，Roa-Rodriguez，C. and Jefferson，R. A.（2005）Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433，629-633.
2. Jones，H. D.，Doherty，A. and Wu，H.（2005）Review of methodologies and a protocol for the Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* 1，5.
3. Lazo，G. R.，Stein，P. A. and Ludwig，R. A.（1991）A DNA Transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio-Technology* 9，963 967.
4. Wu，H.，Sparks，C.，Amoah，B. and Jones，H. D.（2003）Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep*. 21，659-668.
5. Hellens，R. P.，Edwards，E. A.，Leyland，N. R.，Bean，S. and Mullineaux，P. M.（2000）pGreen：a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol*. 42，819-832.
6. Amoah，B. K.，Wu，H.，Sparks，C. and Jones，H. D.（2001）Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *J. Exp. Bot*. 52，1135-1142.
7. Wu，H.，Doherty，A. and Jones，H. D.（2008）Efficient and rapid Agrobacteriummediated transformation of durum wheat（*Triticum turgidum* L. ssp *durum*）using additional virulence genes. *Transgen. Res*. 17，425-436.
8. Sparks，C. A. and Jones，H. D.（2004）Transformation of wheat by biolistics，in *Transgenic Crops of the World Essential Protocols*，（Curtis，P.，ed.），Kluwer，Dordrecht，pp. 19-35.
9. Sambrook，J.，Fritsch，E. F. and Maniatis，T.（1989）*Molecular Cloning*：*A Laboratory Manual*，2nd ed.，Cold Spring Harbor Laboratory，New York.
10. Tingay，S.，McElroy，D.，Kalla，R.，Fieg，S.，Wang，M. B.，Thornton，S. and Brettell，R.（1997）*Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J*. 11，1369-1376.
11. Wu，H.，Sparks，C. A. and Jones，H. D.（2006）Characterisation of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed* . 18，195-208.

第6章　小麦花器官转化

Sujata Agarwal　Star Loar　Camille Steber　Janice Zale

摘　要：本章介绍了一种类似于拟南芥花序浸染法的方法用于小麦花器官的转化。此方法不依赖离体胚的组织培养，而是选择在单核小孢子发育的早、中、晚期（孕穗期），将携带有花青素报告基因和*NPTII*选择标记基因双元载体的农杆菌菌液直接侵染剪有切口的小花。以报告基因花青素导致胚颜色的变化为指标来检测 T_1 代小麦种子。待转基因种子萌发后，在苗期进行转基因筛选，对喷洒巴龙霉素具有抗性的植株，表明*NPT*II 基因已经整合到基因组中，随后利用 *NPT*II ELISA 酶联免疫吸附法进一步检测。初步鉴定的转基因植株，其基因组 DNA 经酶解后，利用 Southern 杂交技术，分析 T-DNA 是否已整合进小麦基因组，并最终确定 T-DNA 在转基因阳性株中的拷贝数。在非最佳条件下，转化效率通常为 0.3%~0.6%（转化子的数目/侵染的小花数目）。如果按照转化产生的种子数比结实的种子数来计算，那么更有效的转化效率应该为 0.9%~10%。通过农杆菌菌株、报告基因、转化载体和表面活性剂等影响因素的比较分析，以期最大限度地提高结实率，并获得最优的转化操作程序。

关键词：小麦孕穗期，农杆菌，细胞核转化，花序侵染法

1. 引言

在利用六倍体小麦（*Triticum aestivum* L.）花组织开展农杆菌介导的小麦生殖细胞系遗传转化方法研究中，经历过屡次的希望、屡次的失败。早在 17 年前，小麦的花器官转化方法已有报道，但转化结果很不稳定，目的基因会在后代中重排、丢失［1］。随后，在小麦、大麦和玉米中开展了农杆菌介导的生殖细胞系遗传转化实验，对转基因 T_1 代植株的 Southern 杂交检测证实了目的基因整合的痕迹，然而，这些基因片段并没有能够稳定地遗传到下一代［2］。这种假象可能是由于转化过程中细菌或者自身内生菌的污染造成的［2］。据称，这一方法早期在花粉上做了些尝试，是在开花期或近开花期，将含有农杆菌的基本渗透培养基加入到切开的花中。紧接着，离体胚或者胚性愈伤组织的基因枪轰击法得以发明并利用，而这一转化方法认为不存在细菌污染的风险［3~5］。

小麦的遗传转化既是一门科学，又充满艺术性，因此形成一套稳定的遗传转化操作程序的工作极具挑战性。尤其对基因组比较大的物种进行遗传转化操作时，还面临其他棘手的技术难题。六倍体小麦中每个单倍体基因组的大小约为 17 000 Mb［6］，因此对小麦开展分子操作是不容易的。筛选标记和报告基因的选择也会影响到转化能否成功，

因为许多筛选方式（如抗除草剂）受环境因素的影响。此外，在单子叶植物中特定转化事件的筛选也并不像在双子叶植物中那么明确。目前，我们正在优化小麦花器官的转化操作程序，希望能够开发出产生稳定转化子的转化方法（见注 1）。

2. 材料

2.1　植物材料

Crocus 或 Chinese Spring 小麦种子由美国农业部国家种质资源信息中心提供（http：//www. ars-grin. gov/npgs/）。Crocus 为红色硬粒加拿大春小麦种质系［7］，Chinese Spring 小麦常用于遗传学研究（见注 2）。

2.2　生长设施

（1）一个温控温室或走入式生长箱

（2）标准化盆栽基质，如泥炭土 2 号（Fafard #2）（Knoxville Seed and Greenhouse）

（3）通用型奥绿肥 14-14-14（Osmocote）（Hummert International）

（4）6 in（1 in＝0. 0254 m，后同）塑料盆

2.3　农杆菌的培养

（1）利用标准电激转化法获得的甘油冻存农杆菌单克隆，携带具有 pBECKSred 质粒载体的 AGL1 或 C58C1 农杆菌菌株［8,9］（见注 3）。

（2）含有 50 μg/ml 壮观霉素和 50 μg/ml 利福平的 LB 培养基（Fisher Biotech）。

（3）LB 琼脂平板［LB 固体培养基：12 g/L 的琼脂粉（Fisher），50 μg/ml 壮观霉素，50 μg/ml 利福平］。

（4）YEP 固体培养基：20 g/L 胰蛋白胨，10 g/L 酵母粉，50 μg/ml 壮观霉素，50 μg/ml利福平，200 μmol/L 乙酰丁香酮（3′，5′-二甲氧基-4′-羟基苯乙酮）。乙酰丁香酮溶解于二甲基亚砜中（DMSO）。

2.4　渗透培养基和农杆菌的处理

（1）1/2 MS 培养基（Fisher Biotech）［10］：pH 5. 8，5% 蔗糖（*m/V*），0. 04% Silwet L-77（*V/V*），0. 5 mmol/L MES（2-*N*-吗啉代乙磺酸），200 μmol/L 的乙酰丁香酮（见注 4）［11,12］。

（2）容纳 250 ml 液体的小塑料瓶且能够承受高温高压灭菌。

（3）小且干净的塑料包装袋和用于授粉的玻璃纸袋。

（4）小剪刀和小镊子。

2.5　筛选

（1）解剖镜

（2）商用漂白剂（30%）；1000 ppm（1 ppm = 10^{-6}，后同）的头孢霉素（Fisher）备用［13］。

（3）喷雾用2%巴龙霉素（m/V，Fisher），内含0.2%（V/V）表面活性剂吐温20［14］。

（4）*NPT*II ELISA检测（酶联免疫法）试剂盒（Agdia，Inc，Indiana）和读数可调在540 nm波长的酶标仪一台。

2.6　Southern杂交验证T-DNA的整合并检测拷贝数

见第13章。

3. 方法

3.1　小麦的生长条件

（1）小麦生长的环境温度（温室或气候箱内）不要超过25℃。最理想的白天温度为21~25℃，夜间温度为16℃，且保持16 h的光照。

（2）将含有通用型奥绿肥（Osmocote 14-14-14）的泥炭土基质（Fafart #2）培养基装入6 in盆中，穴播播种小麦种子。必要时，在基质中再加入其他营养素。

（3）虽然没有明确要求光强和光质的具体数值范围，但不能够低于400~500 μE。

（4）在利用农杆菌浸染小麦花器官转化前一次性浇透水，在农杆菌转化处理后2天内不能再次浇水。

3.2　农杆菌的培养和*Vir*基因的诱导

（1）将携带质粒的农杆菌株系（甘油冻存）接种至5 ml的LB培养基中，加入适当的抗生素，以约160 r/min的转速在（22±2）℃条件下培养过夜。

（2）第2天，取2.5 ml摇好的新鲜菌液接种于250 ml YEP培养基中（含抗生素和200 μmol/L的乙酰丁香酮），以160 r/min的转速在（22±4）℃条件下培养至光密度为1.0（OD_{600}）。

3.3　渗透培养基

在室温条件下，将含有YEP/农杆菌的培养基以6000 r/min的转速离心15 min，随后弃掉上清液。轻轻重悬农杆菌到最终浓度1.0（OD_{600}），处理待转化植株前，再将Silwet-77添加至渗透培养基中。

3.4　小麦麦穗的准备与农杆菌的处理

（1）选择孕穗期麦穗（单核小孢子发育的前期、中期和晚期）用于转化。此时的小麦麦穗依然包裹在叶鞘中，长6~7 cm（图6.1，见注5）。

（2）打开叶鞘显露出正在发育的麦穗，其顶端和内部的花由于不育率比较高，可以去掉，也可以保留。其余的花在颖包顶端略下部剪口。

（3）混匀农杆菌渗透培养基，然后将麦穗浸入培养基里面，浸泡1~2 min（见注6）。

（4）用透明的小塑料袋把浸泡后的麦穗套起来，确保塑料袋在2天内能够保持较高的湿度。

（5）去掉塑料袋，让麦穗恢复正常生长。晾干农杆菌处理过的麦穗，由于植物已接近开花期，要用玻璃纸袋覆盖麦穗以防止麦株之间的交叉授粉，并让T_1代种子自然结实（见注7）。

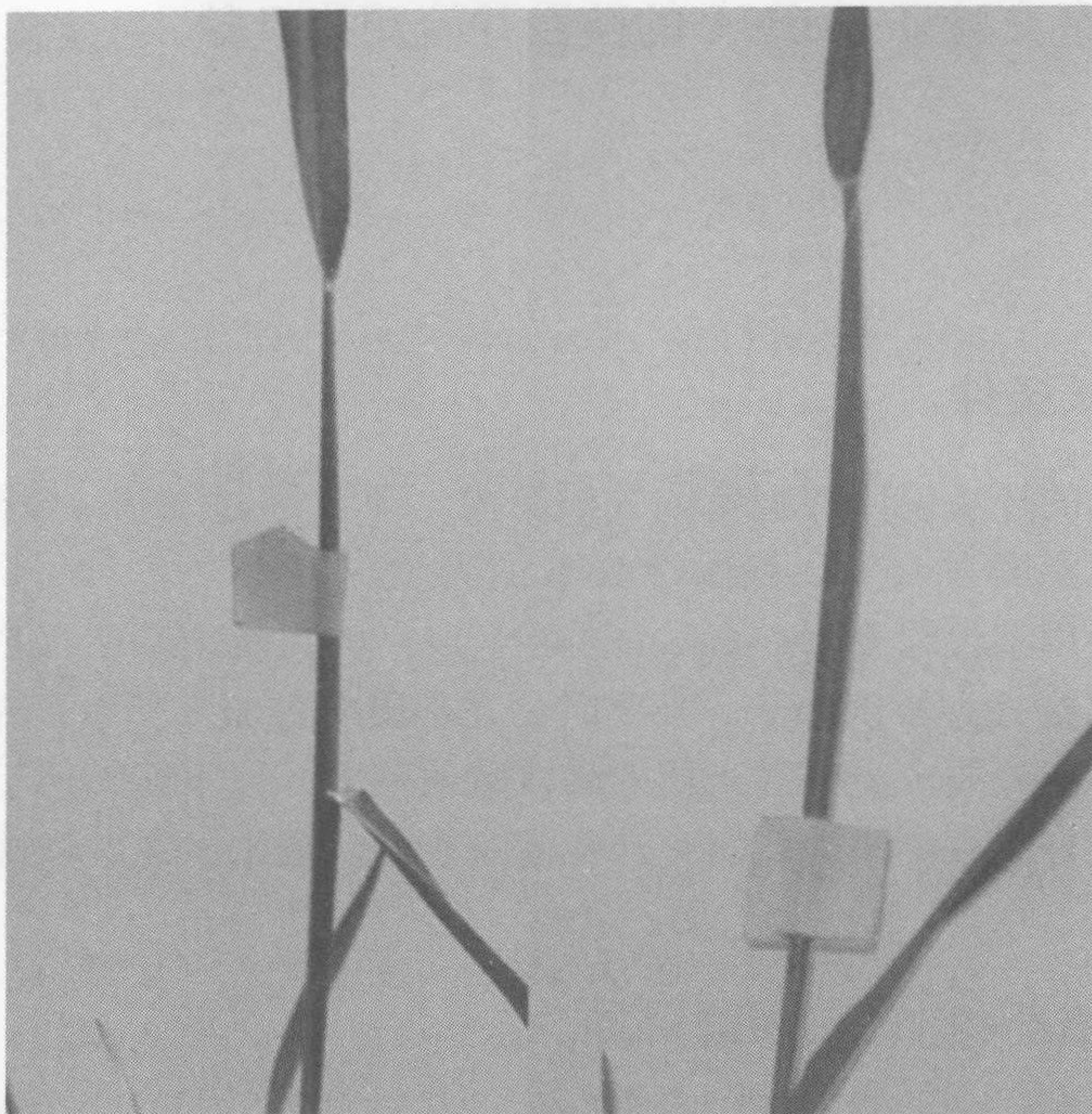


图6.1　拔节早期的小麦。在单核小孢子发育的早期（左）和中后期（右）是最佳的小麦花器官转化阶段。农杆菌侵染处理之前包裹着麦穗的叶鞘需轻轻除去，小花需剪口。用较早期的花器官转化仅能够产生很少量种子

3.5　筛选

在用Southern杂交鉴定拷贝数、逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）或Northern杂交检测目的基因的表达等费时费力的转基因检测方法之前，先用一套简便的方法进行筛选。

3.6　种子的可视化检测

（1）在体式镜下观察，以野生型为对照，筛选胚为红色的T_1代种子（图6.2，见注8）。

（2）选定的转基因种子在30%商用漂白粉溶液中摇动并清洗30 min，以杀死残留的农杆菌，再用灭菌水冲洗3次，每次摇动清洗5 min，随后播种于基质中。

（3）可选程序：在室温条件下，用1000 ppm浓度的头孢霉素处理萌发的转基因苗（步骤1的可选程序——第3.6节）2 h以杀死残留的农杆菌［13］。



图6.2　转基因种子（左）和野生型（右）的对比。经携带有pBECKSred质粒（含有*Lc*/*C*1基因）农杆菌处理而获得的转基因种子与野生型相比，这些转基因阳性种子的胚/胚乳呈现深红色（见图版）

3.7　在整株水平上，利用2%巴龙霉素进行抗性筛选

（1）待转基因苗和野生型植株长至3~4叶期时，喷洒2%（*m/V*）的巴龙霉素［含0.2%（*V/V*）的吐温表面活性剂］［14］。

（2）待植株继续生长5~7天后，分别对抗性和敏感株系进行统计（见注9），选择并保留抗性株作为潜在的转基因阳性株。

3.8　*NPT*II基因的ELISA筛选

（1）参考*NPT*II ELISA酶联免疫操作手册（Agdia Inc.）。

（2）非常重要的一点是，用野生型对照植物的蛋白提取液溶解试剂盒中的*NPT*II标准样品。

（3）为了避免假阳性，尽可能选择一个以上的野生型植株作为阴性对照（见注10）。

（4）选取转基因植株的健康组织，添加Agdia蛋白提取液，用微离心管提取并浓缩蛋白质样品（组织质量：缓冲液体积=1：5）。用1 ml的枪头浸没植物组织，再用杵碾磨，离心5~10 min（约12 000 r/min的转速），取上清液保存备用。以上实验过程均在4℃条件下操作。

（5）每个样品尽可能分装一式三份，取出其中一份样品用于ELISA检测。

（6）检测结束后，加入3 mol/L的H_2SO_4以终止反应，然后在酶标仪上选择450 nm波长进行定量检测。ELISA读数普遍高于野生型的单株可以初步判断为阳性转化株。

3.9 利用 Southern 杂交验证 T-DNA 的整合及检测拷贝数

分别提取转基因植株、野生型对照和质粒基因组 DNA，待 DNA 酶解消化完全后，经琼脂糖凝胶电泳对酶切片段进行分离、转膜，最后用目的基因的互补探针进行杂交检测。见第 13 章。

4. 注释

注 1：申报的专利名称“植物中谷类作物的转化”，美国编号：11/112，393。专利申报提交日期：2005 年 4 月 22 日。

注 2：打破 Crocus 种子休眠的方法。为加快种子萌发，在 4℃ 条件下将种子置于湿滤纸上处理。Crocus 和 Chinese Spring 均携带有双隐性基因，易于与黑麦杂交［7,15］。目前，尚不清楚这种转化方法是否具有基因型依赖性。

注 3：pBECKSred 转化载体携带 *NPT*II 选择标记基因，由 nos 启动子驱动表达。伴随着转基因过程的发生，*Lc/C*1 花青素调控子具有自主指示剂的作用，它能够使胚性组织显示红色［8,16］。虽然利用这套载体系统已经得到了一些转化子，但 pCambia 载体系列仍以其基因组小、序列已知、在农杆菌中呈现稳定遗传等优点被用作转化的首选载体［17］。除 *C*1 基因外，来自玉米转录因子的 *B-Peru* 等位基因也可用做报告基因，该转录因子基因在花青素代谢途径中起调控作用［18］。含有 35S：*adhI* 内含子：*B-Peru* 和 35S：*adh*1 内含子：*C*1 报告基因表达盒的结构已克隆至 pCambia2200 表达载体中，若有需要，我们可以提供以上构建好的转化载体。pCambia2200 载体也携带有 *NPT*II 选择标记基因，而且整合了双 35S 启动子，更益于基因的表达。由于在 pBECKSred 和 pCambia 系列载体中的 *NPT*II 基因不具有内含子结构，有可能使 35S 和 nos 启动子驱动的 *NPT*II 基因在农杆菌中低水平表达［19］。pCambia 载体含有多克隆位点，有利于目的基因的克隆。C58C1 和 AGL1 这两种农杆菌菌株已用于小麦的遗传转化。

注 4：在转化过程中，使用 200 μmol/L 至 1 mmol/L 浓度的乙酰丁香酮处理对种子的结实率均不产生明显影响。

注 5：麦穗在不同环境条件下生长发育的差异。毫无疑问，在孢子发育阶段，花药可以固定在甲醛：冰醋酸：乙醇（1：1：3）溶液中处理 24 h，随后存储在 70% 乙醇中。在 1% 的醋酸洋红中染色 1 h 后，再在光学显微镜下检测［20］。穗中部的花比末端的成熟较早。在单核小孢子发育早期阶段的麦穗经农杆菌处理会导致种子的结实率明显降低；然而在小孢子发育后期阶段经农杆菌处理的麦穗，转化效率呈现显著的下降。此发育阶段的小麦麦穗非常脆，在利用农杆菌菌液侵染时尽可能不折断、碰伤它。

注 6：在某些异常环境温度条件下，如热胁迫处理，有必要减少浸泡的时间或降低 Silwet L-77 的浓度，以最大限度地提高种子的结实率。在推荐的转化条件下，经农杆菌处理所收获的种子结实率相当于正常可育结实率的 22%～23%。

注 7：个别 Chinese Spring 栽培种的异交率相当高［21］，因此防止交叉授粉是必要的。然而，在农杆菌处理后至晾干的这段时间里，小麦穗上透明纸或玻璃纸袋的覆盖会

提高湿度，从而导致霉菌的生长。

注 8：如果转化载体的结构中含有 *Lc* 或 *C*1 基因，那么 T_1 代阳性转化株的胚应该呈现红色。应该注意的是，强烈的胁迫会使本来呈现红色胚的小麦种子进而呈现深红色。因此，有必要确定 T_1 代种子胚颜色的改变究竟是由农杆菌胁迫引起的，还是由转化事件的发生引起的。尽管在实验中增加对照处理对于区分真正的转化事件帮助不大，但还是应该考虑在实验中增加以下对照，如单独用渗透培养基的处理或用不含 Silwet 农杆菌渗透培养基的处理。

注 9：巴龙霉素是氨基糖苷类抗生素 G418 的一种，可喷洒于整株植株上［14］。能够对巴龙霉素产生抗性的植株表明 *NPT*II 基因已整合进基因组。如果有 *NPT*II 基因的存在，与野生型植株相比，喷洒巴龙霉素后植物仅会出现微小的白化或斑点。在统计转基因植株时，尽可能考虑到启动子的强度。由弱启动子（如 nos）驱动 *NPT*II 基因表达所获得的转基因植株与野生型相比，可能出现白化的差别不大。

注 10：假阳性产生的原因可能是由于在提取过程中，细胞碎片未能够通过离心完全去除。

注 11：由于花青素的转录调控蛋白对白小麦具有毒性［9］，获得的 T_1 代种子能够正常萌发，但可能会在开花前死掉（J. Zale，未发表的观察记录）。

注 12：证明拟南芥的雌配子体含有 T-DNA 插入片段［22］。目前，并不能够确定目标 T-DNA 片段是来自于小麦的雌配子体还是雄配子体。

注 13：农杆菌的污染可能会导致假阳性的出现，因此 PCR 方法不用于 T_1 代转化株系的鉴定。

致谢

以上内容的研究工作得到国家科学基金（No. 0638421）和美国农业部国家发展基金（No. 2001-01856）项目的资助。

（李付振　译）

参考文献

1. Hess, D., Dressler, K. and Nimmrichter, R. (1990) Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L), *Plant. Sci.* **72**, 233-244.
2. Langridge, P., Brettschneider, R., Lazzeri, P. and Lorz, H. (1992) Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment, *Plant J.* **2**, 631-638.
3. Vasil, V., Castillo, A., Fromm, M. and Vasil, I. K. (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryogenic callus, *Bio/Technology* **1**, 667-674.
4. Weeks, J. T., Anderson, O. D. and Blechl, A. E. (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Physiol.* **102**, 1077-1084.
5. Nehra, N., Chibbar, R., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C., Steinhauer, L., Baga, M. and Kartha, K. (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs, *Plant J.* **5**, 285-297.

6. Bennett, M. D. and Leitch, I. J. (1996) Nuclear DNA amounts in Angiosperms, *Ann. Bot.* **76**, 113-176.

7. Zale, J. and Scoles, G. (1999) Registration of Crocus hard red spring wheat, *Crop Sci.* **39**, 1539-1540.

8. McCormac, A. C., Elliott, M. C. and Chen, D. F. (1997) pBECKS. A flexible series of binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Mol. Biotechnol.* **8**, 199-213.

9. McCormac, A. C., Wu, H., Bao, M., Wang, Y. Q., Xu, R., Elliot, M. C. and Chen, D. F. (1997) The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery to wheat and barley, *Euphytica* **99**, 17-25.

10. Murashige, T. and Skoog, F. A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*. 15, 473-497.

11. Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, *C. R. Acad. Sci*. 316, 1194-1199.

12. Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J*. 16, 735-743.

13. Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., Nozue, M. and Kojima, M. (2006) Development of simple and efficient in *planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*, *J. Biosci. Bioeng*. **102**, 162-170.

14. Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. and Wan, Y. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Physiol*. **115**, 971-980.

15. Lamoureux, D., Boeuf, C., Regad, F., Garsmeur, O., Charmet, G., Sourdille, P., Lagoda, P. and Bernard, M. (2002) Comparative mapping of the wheat 5B short chromosome arm distal region with rice, relative to a crossability locus, *Theor. Appl. Genet*. **105**, 759-765.

16. McCormac, A. C., Elliott, M. C. and Chen, D. F. (1999) pBECKS2000: a novel plasmid series for the facile creation of complex binary vectors, which incorporates "cleangene" facilities, *Mol. Gen. Genet*. **261**, 226-235.

17. Cambia (2007) Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture in Canberra, Australia, June 15, 2007 (http://www.cambia.org/daisy/cambia/585).

18. Selinger, D. A. and Chandler, V. L. (2001) *B-Bolivia*, an allele of the maize *b*1 gene with variable expression, contains a high copy retrotransposon-related sequence immediately upstream, *Plant Physiol*. **125**, 1363-1379.

19. Jacob, D., Lewin, A., Meister, B. and Appel, B. (2002) Plant-specific promoter sequences carry elements that are recognised by the eubacterial transcription machinery, *Transgen. Res*. **11**, 291-303.

20. Rybczynski, J. J., Simonson, R. I. and Baenziger, P. S. (1991) Evidence for microspore embryogenesis in wheat anther culture, *In Vitro Cell. Dev. Biol*. **27**, 168-174.

21. Hucl, P. and Matus-Cadiz, M. (2001) Isolation distances for minimizing out-crossing in spring wheat, *Crop Sci*. **41**, 1348-1351.

22. Bent, A. F. (2000) Arabidopsis *in planta* transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species, *Plant Physiol*. **124**, 1540-1547.

第7章　植物原位接种介导的小麦高效农杆菌转化方法

Thierry Risacher　Melanie Craze　Sarah Bowden　Wyatt Paul　Tina Barsby

摘　要：本章详细介绍了一种重复性好的农杆菌介导的春小麦转化方法，即通过将农杆菌菌液直接接种到小麦的未成熟种子中进行转化，该方法已申请专利 WO00/63398 [1]。其转化效率为1%~30%，通常可获得至少5%的平均转化效率。转化获得的再生植株整体表现正常，其中30%~50%的植株为目的基因单位点插入，此概率高于由基因枪介导的转基因方法。

关键词：小麦，农杆菌，转化，幼胚，植物原位接种

1. 引言

自从常规的农杆菌转化体系成功地引入到较难转化的农作物以后，许多研究小组开始致力于开发农杆菌介导的小麦转基因技术。虽然直接的 DNA 导入法可用于小麦的转化 [1~4]，但对育种家、监管机构以及研究基因功能的人员而言，直接导入的方法造成多位点插入常常带来诸多不便。目前，几个研究小组已经建立了农杆菌介导的转化小麦及其他单子叶作物的方法，所报道的转化效率各有不同 [5] （见第5章、第6章、第9章）。

下面所列的方案 [6] 与其他已报道的小麦转化方法有所不同，农杆菌浸染的对象是仍在发育的种子幼胚。这样做可避免其他方法中所需的复杂而精细的技术操作，如润湿剂的使用和渗透调节 [7~9]。该方法在实际操作中更为简便、快捷，且无需体外共培养，实验可以迅速启动。

下面所举的范例是用超毒力的 EHA105 农杆菌来转化一种春小麦品种（这里称为 NB1），该农杆菌中带有双元载体（superclean vector，SCV）[11]，载体中含有以水稻肌动蛋白启动子 [12] 驱动的β-葡萄糖苷酸酶基因 [13]，并以地三叶草矮缩病毒 Sc4 启动子 [14] 启动新霉素磷酸转移酶（neomycin phosphotransferase Ⅱ，Npt Ⅱ）[15] 作为筛选标记。

2. 材料

2.1　母体植株的生长

（1）将母体植株种植于12，7F（直径为13 cm）的盆钵中，每盆4株。

（2）用 Levingtons M2 培养土，并施用5g/L奥绿专用缓释肥（15∶9∶9 + 3MgO + TE；释放周期达5~6个月），并在介质表层铺一薄层蛭石。

（3）用 Teku 植物支撑器（LBS Horticulture Colne Lancashire，UK）来支撑植株。

（4）托盘中铺上 Aquamat（LBS Horticulture），每盘放6罐（底部宽30 cm、长50 cm的深砾石托盘）。

（5）由 Octamitters 控制浇水。

（6）所使用的生长箱是 Conviron PGV/PGW 36。

2.2　小量甘油农杆菌制备法

需要准备以下材料：

（1）LB 培养基（Sigma-Aldrich）

（2）通用型试管（25 mL，Sterilin）

（3）85∶15 的 LB 培养基/甘油溶液（Sigma-Aldrich）

2.3　农杆菌制备及接种

需要准备以下材料：

（1）YEP 固体培养基：5 g/L 酵母提取物，10 g/L 蛋白胨，5 g/L NaCl，15 g/L 琼脂，pH 6.8（以上均购自 Sigma-Aldrich）。

（2）TSIM 培养基：4.4 g/L MS 盐和维生素（MP Biomedicals），100 mg/L 肌醇，10 g/L蔗糖，500 mg/L MES 缓冲液（以上均购自 Sigma-Aldrich），pH 5.2，过滤除菌。

（3）乙酰丁香酮（3,5-diphenoxy-4-hydroxyacetophenone）（Sigma-Aldrich），0.1 mol/L 水溶液。

（4）25 μl 至 2.5 ml Hamilton 可重复使用的注射分液器（图 7.1）。

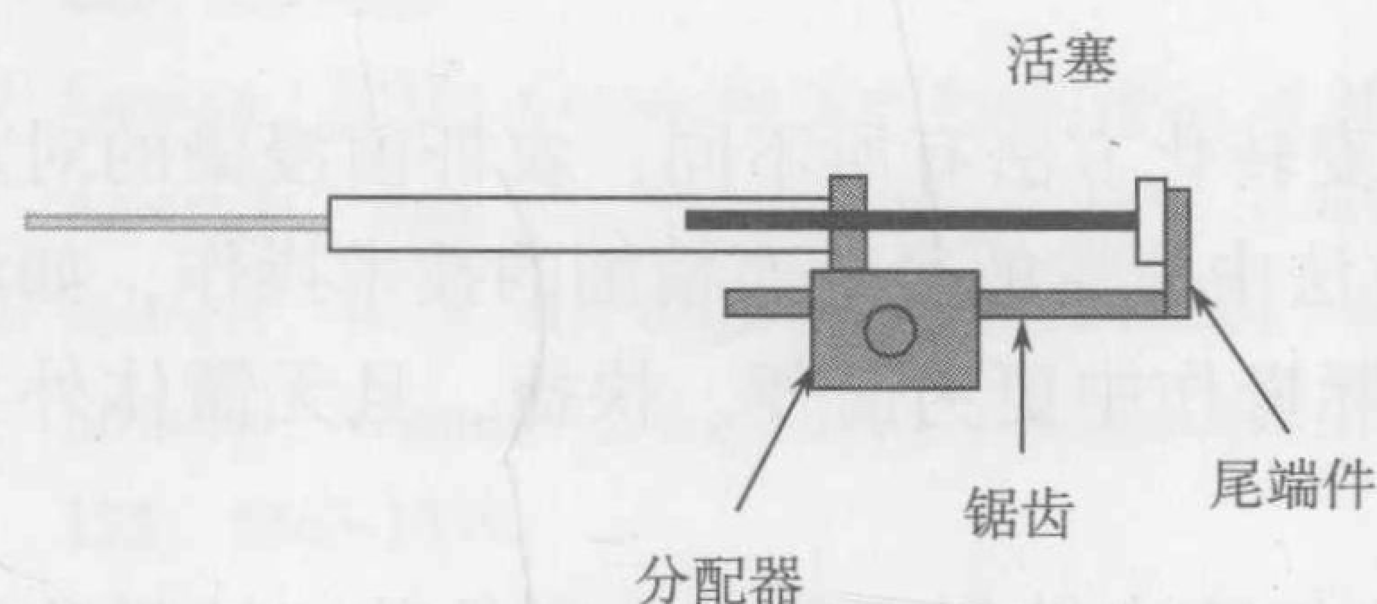


图 7.1　注射器及分液器

（5）Hamilton 注射器（50 μl），带针头。

（6）量筒（500 ml）

（7）玻璃棒或类似的支持物

（8）透明塑料袋（455 mm× 600 mm）

（9）Sanyo 多功能环境监测箱

2.4　组织培养

需要用到以下材料：

（1）Domestos 漂白剂（Lever Bros）

（2）乙醇溶液（70% *V/V*）：以去离子水配制

（3）无菌去离子水

（4）带 15 号刀片的手术刀（Swann-Morton，Sheffield，UK）

（5）W4 培养基：4.4 g/L MS 盐和维生素（MP Biomedicals），20 g/L 蔗糖（Merck KGaA，Germany），2 mg/L 2，4- D，钠盐（Sigma-Aldrich），500 mg/L谷氨酰胺（Sigma-

Aldrich），100 mg/L 酪蛋白水解物（Sigma-Aldrich），6 g/L 1-A 型琼脂糖（Sigma-Aldrich），150 mg/L 特美汀（ticarcillin disodium/potassium clavulanate）（Melford Laboratories Ipswich，UK），pH 5.8。表7.1列出了培养基添加剂的制备细节。

（6）W425G 培养基：其余同 W4 培养基，额外加入 25 mg/L G418，重硫酸盐（Sigma-Aldrich）。

（7）MRM 培养基：4.4 g/L MS 盐和维生素（MP Biomedicals），20 g/L 蔗糖（Merck KGaA，Germany），6 g/L 1-A 型琼脂糖（Sigma-Aldrich），2 mg/L 激动素（Sigma-Aldrich），pH 5.8。

（8）MRM25G 培养基：其余同 MRM 培养基，额外加入 25 mg/L G418，重硫酸盐（Sigma-Aldrich）。

（9）Beatson 广口瓶（250 ml，Richardsons，Leicester，UK）以有盖培养皿的底作为盖子，并以 25 mm 3M Micropore™的胶带封口。

（10）MS20 培养基：4.4 g/L MS 盐和维生素（同前），20 g/L 蔗糖（Merck KGaA，Germany），7 g/L 经植物细胞培养测试过的琼脂（Sigma-Aldrich），pH 5.8。

（11）Sanyo 多功能环境监测箱

表 7.1　制备培养基的添加剂

组织培养添加物	溶剂/稀释剂	过滤除菌或高压灭菌	储备液浓度/(mg/ml)	终浓度/(mg/L)
2,4-D	1mol/L NaOH/H_2O	高压灭菌	1	2
激动素	1mol/L NaOH/H_2O	过滤除菌	1	2
特美汀	H_2O	过滤除菌	100	150
G418	H_2O	过滤除菌	10	25

注：组织培养基的添加剂母液必须时常更新，并保存于-20℃

每升培养基所需的激动素用 100 ml 水配好后，过滤灭菌，并将 pH 调至 5.8，然后加到定容过的蒸汽灭菌后的培养基

2.5　转基因幼苗的生长

需要用到以下材料：

（1）Jiffy 7 泥炭颗粒（Jiffy 产品，Norway）

（2）播种托盘及相应的 24 孔穴盘（可任选供应商）

（3）适合播种盘大小的培养箱（可任选供应商）

2.6　转基因植株的生长

需要用到以下材料：

（1）12F（直径 12 cm）盆钵，每盆种一株。

（2）用 Levingtons M2 的混合肥培养植株，并施以 5g/L 奥绿专用缓释肥（同前）。

（3）用 Pea sticks/split canes 作为支撑物

（4）微孔面包袋（Focus Packaging）用于套袋

3. 方法

3.1 母株的生长

（1）将种子播至施有缓释肥的 M2 混合肥中（同上），深度为 2~3cm（每罐 4 颗）。

（2）在盆的表层铺一薄层蛭石，以保持表层混合肥的质量。每罐放一个 Teku 植物支持器。

（3）把盆栽放在 Conviron 生长箱里，培养条件是白天 20℃、夜晚 15℃，16h 光周期，400 μE/(m^2 · s）的光照（见注 1）。

3.2 收获

（1）开花 16~18 天后收获分蘖，此时胚长至 1 mm 大小。从植株基部剪掉分蘖（见注 2）。

（2）弃去底部的叶片，保留剑叶。

（3）将分蘖立即放入装有水的 500 ml 量筒中，修剪分蘖的长度以使剑叶正好位于量筒的顶部。

3.3 脱粒

（1）去除每穗底部 2~3 个小穗。

（2）从下往上选取第一和第二朵花（图 7.2），小心地从花上去除颖片和外稃，仅使这两朵花的未成熟种子暴露出来。

（3）剪去干扰接种的残余组织，即未动过的花（如第三、第四朵花等）的外稃/颖片及芒，切忌损伤裸露的种子，否则会导致共培养时真菌的污染。

（4）用软刷向上刷穗以去除花药，否则也可能引起真菌生长。

（5）用湿纸巾擦拭叶片。

（6）轻轻地用 70%（*V/V*）乙醇喷穗部，使其在接种前干燥（见注 3）。

3.4 制备农杆菌平板

（1）制备少量含有质粒的甘油农杆菌。

（2）从母板上挑取一个单克隆，在加有相应抗生素的 LB 培养基［16］里，28℃剧烈振荡培养过夜。取 1 ml 到 Eppendorf 管中，10 000 *g* 离心 30 s。去上清，并用 1 ml 加有 15%（*m/V*）甘油的 LB 重悬细胞。分装成小份，在-80℃保存。每次接种用一份新的甘油农杆菌，使用后弃之。

（3）接种实验前，用保存的甘油农杆菌在含有相应抗生素的 YEP 平板上划线，使整块平板上长满菌斑。

（4）封板，28℃ 培养 1 天，或者室温培养 3 天。

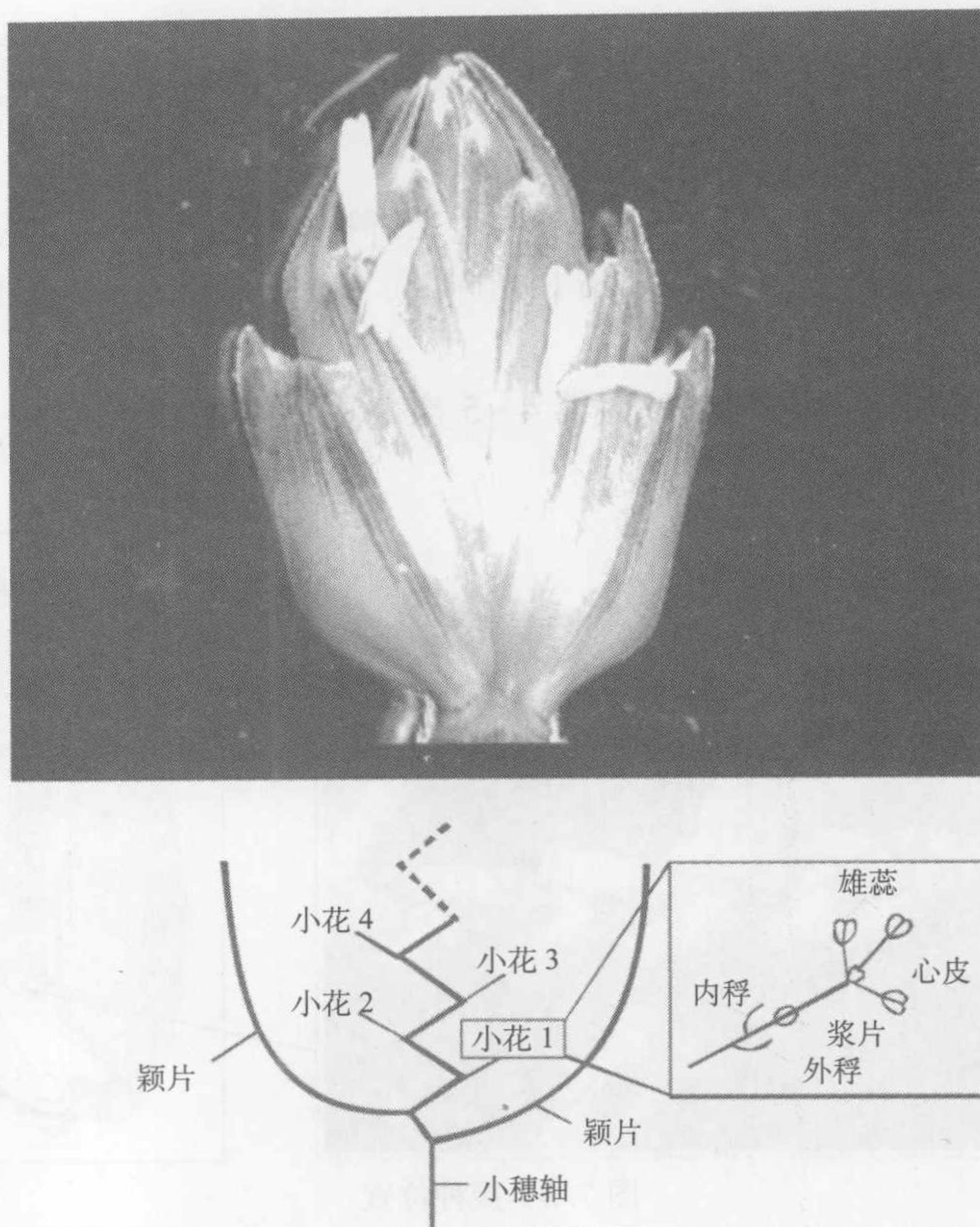


图7.2　小麦花的解剖结构。图片复制于 WHEAT：THE BIG PICTURE（http://www.wheatbp.net）

3.5　农杆菌重悬

（1）用于接种的麦穗准备好之后，开始制备农杆菌的悬浮液。

（2）用乙醇擦拭并烧灼一个平头铲，使之充分冷却下来。

（3）用刮铲轻轻刮平板的表面来收集足量细菌，然后转移到含有10 ml TSIM 和400 μmol/L乙酰丁香酮的25 ml Universal 管中。应避免带上平板上的胶，因为这会影响接种过程。

（4）用1 ml 的 Gilson 移液枪反复吹打重悬细菌，直到变为均匀的悬浊液。

3.6　接种

（1）用70%（*V/V*）乙醇对注射器进行消毒处理4~5次，然后用无菌水冲洗4~5次。确保针孔朝向自己。

（2）用注射器吸取农杆菌悬浮液。

（3）手握住穗部，使针尖可以接触到种子的胚。把针放入穗部使针尖大约位于胚乳和盾片的接合部（图7.3）。盾片轻微的损伤不会产生影响，而且可作为正确接种的证据。

(4) 每次缓慢按下按钮注射 1 μl 悬浮液。50 μl 的注射器，每按一次按钮注射 1 μl 悬浮液。

(5) 对所有外露的种子重复这一过程。

(6) 在所有穗都接种后，在量筒中放一个支持物（如玻璃棒），然后用透明的塑料袋覆盖并在底部封口。让其在 22℃、16 h 光周期、40 μE/(m^2·s) 光照条件下生长 2~3 天（见注 4）。

(7) 用 70%（*V/V*）乙醇清洗注射器 4~5 次，用无菌水冲洗 4~5 次，再用 70% 乙醇洗一次，然后晾干。

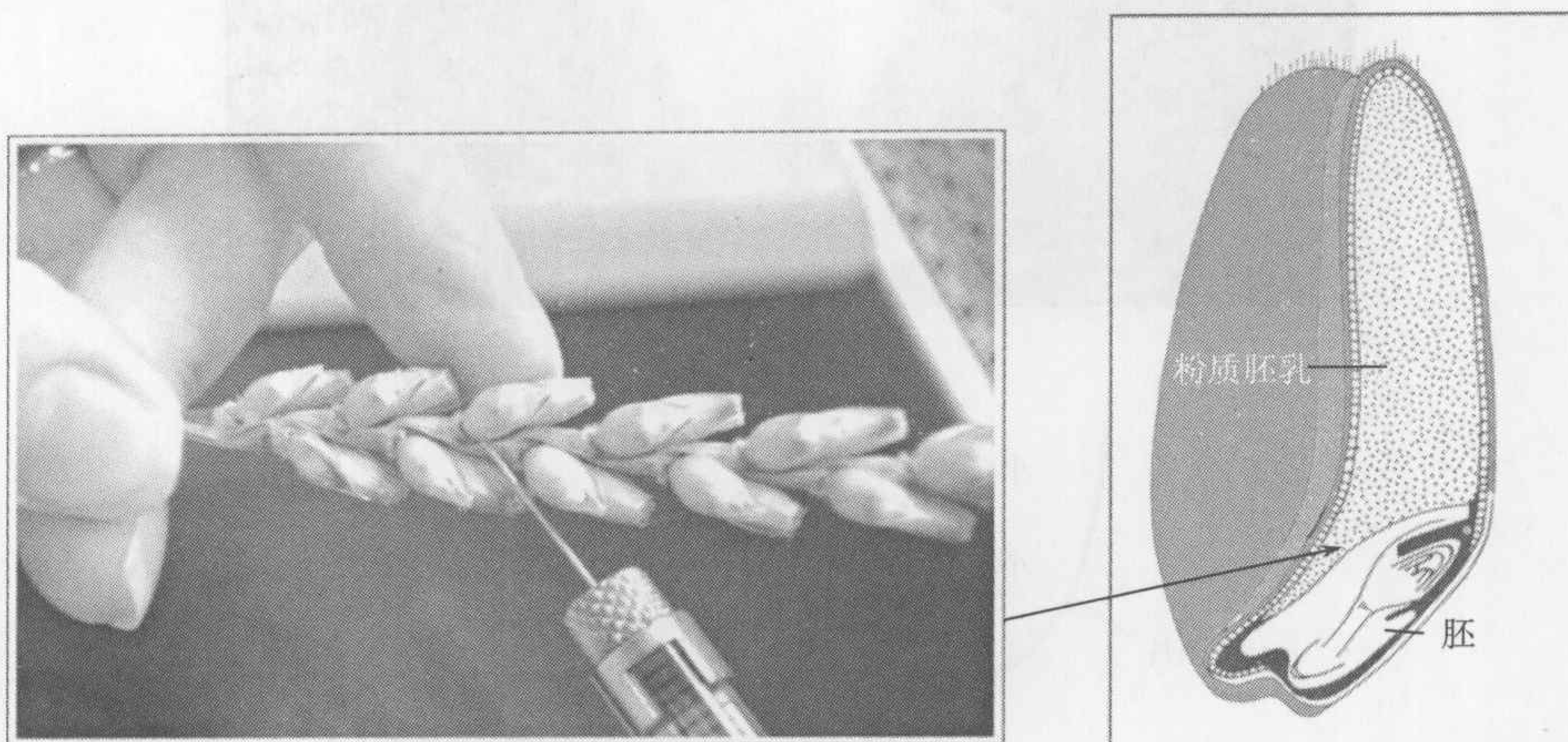


图 7.3　接种位置

3.7　隔离

(1) 接种 2~3 天后，将种子从穗上取下放入适合的有盖容器中。

(2) 对种子进行表面消毒：70%（*V/V*）乙醇 1 min，20%（*V/V*）Domestos 漂白剂溶液 25 min，期间要搅拌。

(3) 在滤网中用无菌去离子水彻底清洗。

(4) 分离胚，然后放入 W4 培养基中，盾片向上，每皿放 25 个（见注 5）。

(5) 用 Parafilm 膜密封平板，然后在 28℃、16 h 光周期、80 μE/(m^2·s) 光照条件下培养 5 天。

3.8　组织培养

(1) 5 天后，将胚轴从盾片上切除（见注 6），然后转移到新鲜的 W4 培养基上（见注 7）。

(2) 培养 12 天后，将愈伤组织移到选择培养基上（W4 25G）。在 25℃、16 h 光周期、80 μE/(m^2·s) 光照条件下培养 2 周（接下来的操作都在这一温度和光照条件下进行）。

(3) 选择 2 周后，将愈伤组织分成小块以便更好地接触到选择培养基，然后移到新鲜的 W4 25G 培养基上。

（4）继续选择培养2周后，将有活力的胚性愈伤移到含有选择试剂的再生培养基上（MRM25G）。2周后再进行一次转移，将还未发育成芽的愈伤移到新的MRM25G培养基中。

（5）将再生的芽移到含有MS20的Beatson罐，然后让其在25℃下培养（见注8）。

（6）让芽生长大约1个月，在这期间叶和根应该发育完全。

3.9 土壤移植和炼苗

（1）用自来水湿润Jiffy 7泥炭丸并放置于24孔穴盘中，将穴盘放到培植箱中。

（2）从Beatson罐中把苗移出，避免根部带上琼脂。

（3）将丛生的苗分开直至每一株苗只有一个芽。

（4）将苗移到Jiffy 7泥炭丸中，确保所有的根被Jiffy包埋，使得根能够接触到泥炭。去掉死的和将死的叶片。将生长中的叶片修整到5~10 cm。在重新盖上培植箱盖前撒点水（见注9）。

（5）在20℃生长2周后，如需要，植株可以用来做PCR检测和盆栽（见注10）。

（6）为获得最大的产量，可将苗移到带M2培养土的12F罐中（见上），每罐一株苗。在将苗转移到土壤的过程中不要去除Jiffy泥炭丸外的网以保持泥炭丸的完整。

（7）将开花的植株套袋以减少花粉的传播。

4. 注释

注1：母株材料的状况至关重要，生长过程中可通过生物防治遏制病虫害。

注2：就转化效率而论，初级和二级分蘖结果一样。

注3：一旦用于接种的麦穗已准备好，并已露出种子，要尽快用宽松的塑料袋罩住分蘖，以防止种子失水萎缩。

注4：确保剑叶在袋子中均匀分布，使在共培养过程中获得最大的光照。

注5：将剥离的种子移到含有特美汀的培养基上后，其胚周围任何明显的农杆菌生长都将被明显抑制住。

注6：不论胚轴是否生长，都要将其从胚上去除。

注7：去除胚轴后只培养4~5天就移到新的培养基上，这样有助于愈伤组织的产生。

注8：从起始接种的胚分出的愈伤组织会再生出多个株系，这些株系可能来自多个不同独立整合事件。除非用Southern杂交证明其是独立株系，一般只需将来自同一愈伤组织的一株苗移至土中，这可提高转化效率。

注9：转移到Jiffy 7泥炭丸后，在放入培养箱之前对苗洒水，促使形成潮湿的环境。3~4天后，打开培养箱的通风口炼苗；培养箱的盖子在一周后可去掉。

注10：炼苗后植物会在Jiffy 7泥炭丸上快速生长，要在去掉培养箱后的1~2周内进行盆栽。对短期实验，如只是用来做PCR分析，植物可种在Jiffys中而不用盆栽，但要定期施肥（MiracleGro，制造商推荐用浓度）。

（徐　磊　易可可　译）

参 考 文 献

1. Christou, P. (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J.* 2, 275-281.

2. Taylor, N. J. and Fauquet, C. M. (2002) Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol*. 21, 963-977.

3. Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Cannell, M., Barcelo, P. and Lazzeri, P. A. (2001) Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 52, 865-874.

4. Barsby, T., Power, J. B., Freeman, J., Ingram, H. M., Livesey, N. L., Risacher, T. and Davey, M. R. (2001) Transformation of wheat, in *The World Wheat Book-A History of Wheat Breeding*. Lavoisier Publishing, France and USA, and Intercept Ltd., UK, pp. 1081-1103.

5. Bhalla, P. L., Ottenhof, H. H. and Singh, M. B. (2006). Wheat transformation-an update of recent progress. *Euphytica* 149, 353-366.

6. Risacher, T. and Craze, M. (1992) WO 00/63398. Plant Transformation Method.

7. Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. and Wan, Y. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115, 971-980.

8. Cheng, M., Hu, T. C., Layton, J., Liu, C. N. and Fry, J. E. (2003) Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cell Dev. Biol*. 39, 595-604.

9. Uze, M., Wunn, J., Puonti-Kaerlas, J., Potrykus, I. and Sautter, C. (1997) Plasmolysis of precultured immature embryos improves *Agrobacterium*-mediated gene transfer to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 130, 87-95.

10. Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Transgen. Res* 2, 208-218.

11. Firek, S., Ozcan, S., Warner, S. A. and Draper, J. (1993) A wound-induced promoter driving npt-II expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic shoots. *Plant Mol. Biol.* 22, 129-42.

12. McElroy, D., Zhang, W., Cao, J. and Wu, R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 2, 163-171.

13. Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.

14. Schünmann, P. H. D., Surin, B. and Water-house, P. M. (2003) A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology. II. The pPLEX series for use in monocots. *Funct. Plant. Biol.* 30, 453-460.

15. Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J. -P., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987-995.

16. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

第 8 章　基因枪法转化大麦

Wendy A. Harwood　Mark A. Smedley

摘　要： 微粒子轰击也称基因枪法，已被广泛应用于禾谷类作物的基因转化。这类方法通过加速轰击包裹着质粒 DNA 的金粉微粒而将 DNA 直接带入植物细胞。第一例完全可育的转基因大麦就是采用基因枪法获得的。虽然近年来研究人员在转化大多数的禾谷类作物包括大麦时，也选择采用农杆菌介导的转化方法，但基因枪法对于一些大麦的转化应用仍然很重要，同时它用作瞬时检测系统能快速检验转化载体的正确性。本章介绍了基因枪法转化大麦的过程，以及它在瞬时检测技术中的应用。

关键词： 基因枪法，粒子枪，微粒轰击，大麦转化，幼胚，转基因植物

1. 引言

1994 年，用微粒子轰击，即基因枪法获得首例完全可育的转基因大麦［1］，其后，大量报道采用这种方法获得了转基因大麦。这种方法使用微粒子传输系统（或称“基因枪”）来传送包裹了目标 DNA 的、直径约 1 μm 的金属粒子（或称“微弹”），金粉是制做微弹的首选材料。最常用的基因枪是 Bio-Rad 公司的 PDS 1000/He 微粒子传输系统。通过比较不同的粒子轰击设备，以及各种 DNA 包裹金粉微粒的方法对大麦转化效率的影响［2］，结果发现 PDS 1000/He 对大麦的转化效率最高。与农杆菌介导的转化方法一样，幼胚也是基因枪法的最佳受体组织。其他受体像小孢子［3］和茎尖分生组织［4］也获得成功的应用。春性大麦品种 Golden Promise 最容易进行组织培养，因此，也最容易转化。对组织培养不太敏感的其他大麦品种，也能用基因枪法进行转化［5］，但效率较低。

比较基因枪法和农杆菌介导的大麦转化方法［6］，发现基因枪的转化效率比较低，外源基因的拷贝数较多，更容易造成转基因沉默。因此，目前大多采用农杆菌介导的方法进行大麦转化。然而对于一些应用，如多基因转化来说，基因枪仍然是最好的选择［7］。本章我们介绍了一种对春性大麦 Golden Promise 幼胚进行基因枪转化的方法并使用 *bar* 基因（使受体具有草丁膦抗性）作为选择性标记筛选转基因植株。在随后的第 9 章“农杆菌介导的大麦转化方法”中我们将介绍另一种基于潮霉素抗性的筛选系统。

2. 材料

2.1　植物材料

春性大麦 Golden Promise 植株生长在可控的环境下以提供幼胚进行转化。生长条件：白天 15℃、夜晚 12℃、相对湿度 80%，成熟植物冠层的光照强度为 500 μmol/(m^2·s)（金属卤化物灯 HQI）；生长介质由三种成分构成：Levington M3、珍珠岩、砂砾。介质中还包括缓释肥料奥绿肥，浓度为生产商推荐。更多细节请见第 9 章有关农杆菌介导的大麦转化方法。

2.2　植物组织培养基

在植物转化和再生培养过程中，所使用的基本组织培养基有 4 种：愈伤诱导、渗透处理、过渡培养和再生培养（见注 1）。在筛选阶段向愈伤诱导培养基中加入 5 mg/L 的除草剂双丙氨膦 Bialaphos（Meiji Seika Ltd.，Tokyo，Japan）；在过渡和再生培养的过程中，加入 1 mg/L 的除草剂。如无特殊说明，所有培养基成分皆由 Sigma-Aldrich 公司提供，培养基和试剂配制所需的水皆由 Elga 纯水仪制备。

（1）愈伤诱导培养基：4.3 g/L MS 培养基（Duchefa M0221），30 g/L 麦芽糖，1.0 g/L酪蛋白，350 mg/L 肌醇，690 mg/L 脯氨酸，1.0 mg/L 特美汀 HCl，2.5 mg/L 麦草畏（Sigma-Aldrich D5417），3.5 g/L 植物凝胶。使用 NaOH 将培养基的 pH 调至 5.8。

（2）渗透处理培养基：在愈伤诱导培养基中额外添加 0.4 mol/L 甘露醇（72 g/L）。

（3）过渡培养基：2.7 g/L MS 培养基（不含 NH_4NO_3，Duchefa M0238），20 g/L 麦芽糖，165 mg/L NH_4NO_3，750 mg/L 谷氨酰胺，100 mg/L 肌醇，0.4 mg/L 特美汀 HCl，1.25 mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，2.5 mg/L 2，4-D（Duchefa），0.1 mg/L BAP（Duchefa），3.5 g/L 植物凝胶，调 pH 至 5.8。

（4）再生培养基：2.7 g/L MS 培养基（不含 NH_4NO_3）（M0238 Duchefa），20 g/L 麦芽糖，165 mg/L NH_4NO_3，750 mg/L 谷氨酰胺，100 mg/L 肌醇，0.4 mg/L 特美汀 HCl，3.5 g/L 植物凝胶，调 pH 至 5.8。

培养基储备液：

（5）愈伤诱导 100×维生素储备液：100 mg/L 特美汀 HCl，35 g/L 肌醇，69 g/L 脯氨酸。过滤灭菌后备用，4℃保存。

（6）过渡和再生培养 100×维生素储备液：40 mg/L 特美汀 HCl，10 g/L 肌醇。过滤灭菌后备用，4℃保存。

（7）麦草畏：用水配成 2.5 mg/ml 的储备液，过滤灭菌，分装成每管 1 ml，−20℃冷冻储存。

（8）2,4-D：用无水乙醇配成 2.5 mg/ml 的储备液，−20℃保存。

（9）BAP：用水加少量 1 mol/L NaOH 配成 1mg/ml 的储备液，−20℃保存。

（10）$CuSO_4$ 储备液：125 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 溶于 100 ml 水中，过滤灭菌，4℃保存。

（11）除草剂储备液：用水将双丙氨膦（Bialaphos）配成 5 mg/ml 的储备液，过滤灭菌，−20℃保存。

2.3 用于转化的质粒

图 8.1 所示的 pAL51 质粒已成功用于基因枪法转化大麦。它含有一个玉米泛素启动子调控下的 *bar* 基因表达框，用于筛选转化子。该质粒还含有另一个玉米泛素启动子以驱动目标基因表达，如萤光素酶基因。在第 9 章“农杆菌介导的大麦转化方法”中所介绍的 pBract 系列质粒，也可以用于大麦基因枪转化。

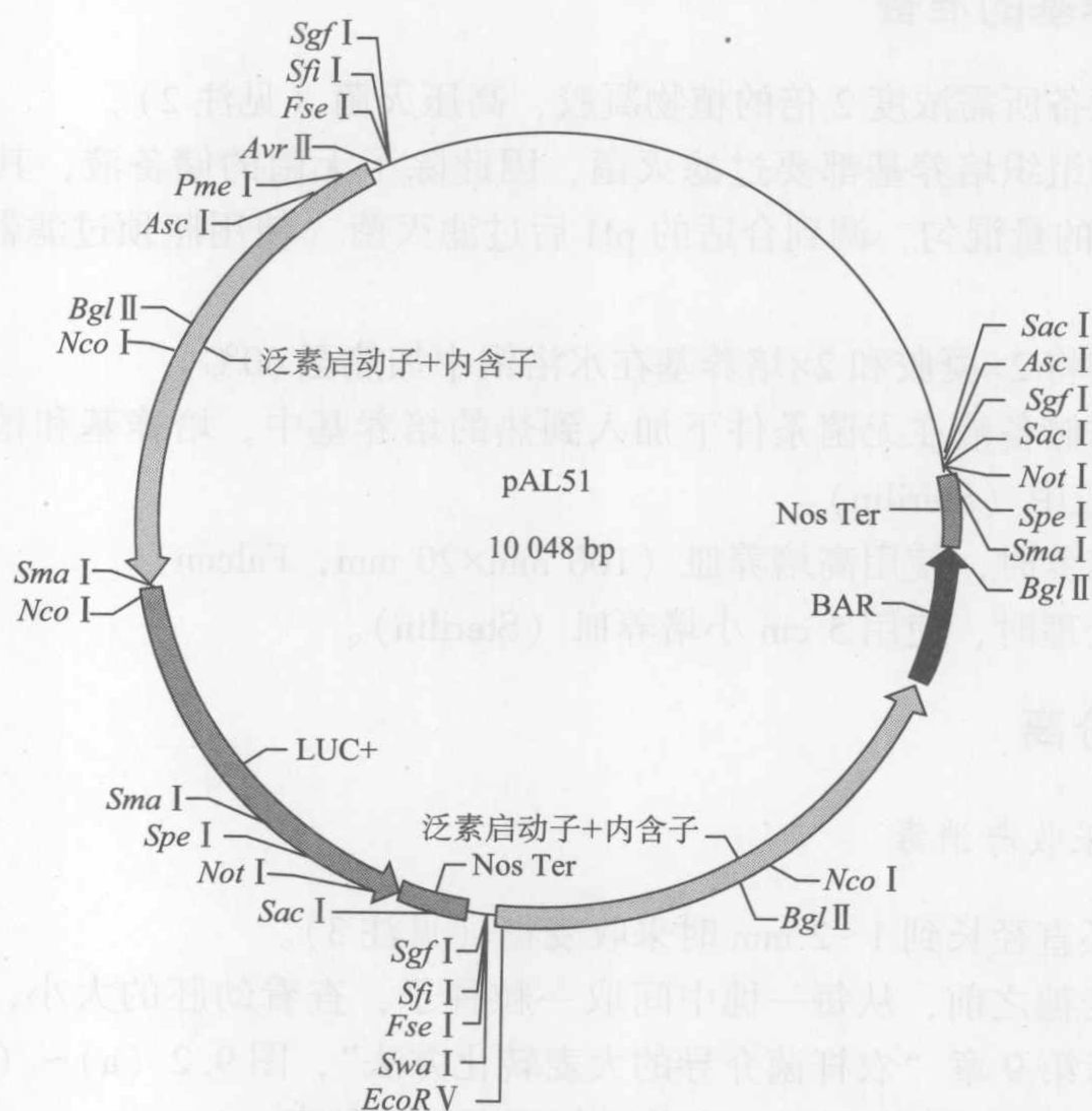


图 8.1 适用于大麦基因枪转化的 pAL51 质粒载体图。该质粒含有由玉米泛素启动子（*Ubi*1）驱动的 *bar* 基因，用于转化子的筛选。另一个 *Ubi*1 启动子用于驱动目的基因的表达，以大麦转化广泛使用的萤火虫萤光素酶标记基因为例［8］

2.4 基因枪

最常用的基因枪是 Bio-Rad 公司的 PDS 1000/He 台式基因枪。大麦转化所需要的耗材如下，均由 Bio-Rad 公司提供：

（1）金粉（1.0 μm）（165-2263）

（2）载体膜（165-2335）

（3）终止屏（165-2329）

（4）破裂盘（1100psi）（165-2329）

2.5　DNA 包裹金粉微粒

（1）亚精胺溶液（0.1 mol/L）

（2）$CaCl_2$（2.5 mol/L）

（3）乙醇（100%）

3. 方法

3.1　组织培养基的准备

（1）首先准备所需浓度 2 倍的植物凝胶，高压灭菌（见注 2）。

（2）所有的组织培养基都要过滤灭菌，因此除了无菌的储备液，其他培养基成分按所需浓度 2 倍的量混匀，调到合适的 pH 后过滤灭菌（使用瓶顶过滤器、0.22 μm 微孔滤膜）。

（3）使用前将 2×凝胶和 2×培养基在水浴锅中加热至 60℃。

（4）将所需储备液在无菌条件下加入到热的培养基中，培养基和植物凝胶混合后倒入 9 cm 培养皿中（Sterilin）。

（5）分化培养时，使用高培养皿（100 mm×20 mm，Falcon）。

（6）渗透处理时，使用 5 cm 小培养皿（Sterilin）。

3.2　幼胚的分离

3.2.1　幼穗的采收与消毒

（1）当幼胚直径长到 1~2 mm 时采收麦穗（见注 3）。

（2）在取麦穗之前，从每一穗中间取一粒种子，查看幼胚的大小，确保达到所需的要求［可参考第 9 章“农杆菌介导的大麦转化方法”，图 9.2（a）~（c）］。

（3）将种子从穗子上取下来，去芒，但不要破坏种壳。

（4）先用 70% 的乙醇冲洗 30 s，再用蒸馏水冲洗 3 遍，然后在次氯酸钠（Fluka 71696）与水比例为 50∶50 的溶液中浸泡 4 min，再用蒸馏水冲洗 4 遍，最后将水倒掉但保持种子湿润，置于无菌的螺口瓶中待用。

3.2.2　分离幼胚摘除胚轴

所有的操作均在超净台中进行：

（1）每次大约取 20 粒无菌种子，置于解剖镜无菌的蓝色或黑色底板上，用一只镊子固定种子，另一只镊子剥出幼胚，去除胚轴（见注 4）。

（2）每皿愈伤诱导培养基放 25~30 枚幼胚，盾片朝上，25℃暗培养。

3.3　制备 DNA 包裹的金粉微粒

3.3.1　制备金粉母液

DNA 包裹金粉微粒的方法与文献［9］中的方法相似

（1）称 40 mg 金粉于 1.5 ml EP 管中，加入 1 ml 100% 乙醇。

（2）涡旋振荡使金粉充分混匀，离心使其沉淀。

（3）倒掉乙醇，重复步骤 2 两次。

（4）最后一次离心后，去除乙醇，加入 1 ml 无菌水涡旋振荡使之重悬。

（5）将金粉以 50 μl 分装于无菌的 EP 管中，分装时注意不断混合以保持金粉颗粒处于悬浮状态，分装后保存在-20℃。

3.3.2　亚精胺制备

（1）将装有 1 g 亚精胺（Sigma-Aldrich）的瓶子置于 65℃水浴锅中加热使之融化。

（2）用移液枪取 14 μl 溶液分装于无菌的 1.5 ml 离心管中，-20℃储存待用。

3.3.3　金粉微粒的包裹

（1）从冰箱中取出亚精胺，并使其解冻。

（2）加入 986 μl 无菌水，涡旋振荡混合。

（3）用 1 ml 过滤器和小的过滤器滤头（Minisart 0.2 μm 过滤器，Sartorius）将溶液过滤到无菌的 1.5 ml 离心管中，制成 0.1 mol/L 亚精胺溶液。

（4）从冰箱中取出一管 50 μl 的金粉并使之解冻。

（5）沿装有金粉的离心管管壁，加入 5 μl DNA（1 μg/μl），立即涡旋振荡使金粉和 DNA 充分混合（见注 5）。

（6）然后将 50 μl 2.5 mol/L $CaCl_2$ 和 20 μl 0.1 mol/L 亚精胺加入到离心管管盖中，盖好盖子，颠倒离心管使 $CaCl_2$ 和亚精胺与金粉颗粒混合（颠倒离心管之前不能让 $CaCl_2$ 和亚精胺与金粉颗粒混合），立刻涡旋振荡使所有组分充分混合。

（7）管子在冰上放置 1 min，然后于 1957 *g* 离心不超过 30 s，使金粉沉淀。

（8）去除上清液，加入 250 μl 100% 乙醇，用枪头轻轻吹打混匀，然后涡旋振荡，这个过程是洗涤包埋了 DNA 的金粉微粒。

（9）1957 *g* 离心不超过 30 s 沉淀金粉微粒，去除上清，加入 60 μl 100% 乙醇。

（10）涡旋振荡重悬金粉颗粒。DNA 包埋的金粉微粒即微载体已制备完毕。

3.4　粒子轰击幼胚

3.4.1　幼胚渗透处理

轰击前，取分离 1 天后的幼胚，放在高渗培养基中处理 4 h。每皿 20~30 枚幼胚，置于培养皿中心 1.6 cm^2 范围内，盾片朝上。胚可以放得紧密一些，但相互之间不要碰到。轰击之后幼胚继续高渗处理 16 h。

3.4.2　基因枪准备

（1）基因枪所有组件和内部的枪体都要用100%乙醇清洗消毒。终止屏和载体膜浸泡在乙醇中消毒，然后晾干。破裂盘在用之前浸泡在异丙醇中，无需再消毒。

（2）载体膜晾干后，先放入载体膜支架，然后吸取3.5 μl包裹了DNA的金粉微粒点到每张载体膜中央。吸取金粉微粒时注意保持悬浮状态。

3.4.3　基因枪参数

基因枪的各个组件在轰击室的位置如下：

破裂盘和载体膜之间的距离：2.2 cm

载体膜和终止屏之间的距离：1.3 cm

终止屏和样品架之间的距离：5.8 cm（枪体基部往上第三挡）

真空度：28 in. Hg.

3.4.4　粒子轰击

（1）在轰击幼胚之前，基因枪先空轰击两次（见注6）。

（2）将1100 psi的破裂盘在异丙醇中浸泡后放置在破裂盘固定帽内，然后将固定帽连接到基因枪腔体内的氦气气体加速管，基部旋紧。

（3）将终止屏放入微载体发射组件中，然后把点有金粉微粒并已干燥的载体膜放入载体膜支架，安装在固定槽中（载体膜有金粉微粒的一面朝下），旋上盖子，将微载体发射组件放在破裂盘固定帽下面的位置上。

（4）把放有幼胚的培养皿放在样品架上，样品架置于从轰击室底往上数的第三挡上，拿走培养皿盖，关上轰击室门，抽真空使真空度达到28 in. Hg后保持，然后轰击。

（5）当真空释放后，打开轰击室门，放回培养皿盖，准备下一次轰击。

（6）轰击后的幼胚在25℃暗培养。

3.5　转化子筛选

（1）轰击后16 h，将幼胚从高渗培养基转移到含有5 mg/L双丙氨膦的愈伤组织诱导培养基中进行选择，25℃暗培养。

（2）每隔两周更换一次含有5 mg/L双丙氨膦的愈伤组织诱导培养基。

（3）选择培养4周后，即第二次更换培养基时，将来源于同一个幼胚的愈伤组织分成3~6个小块，并做好标记，保证来源于同一个幼胚的所有愈伤组织在一起。

（4）选择培养6周后，即第三次更换培养基时，将剩余健康的愈伤组织转移到含有1 mg/L双丙氨膦的过渡培养基中，在25℃弱光下培养，即把培养皿放到有光照的组织培养室中，在每个培养皿上盖一张薄纸片。

3.6　转基因植株再生

（1）在过渡培养基上培养两周后，将来源于同一个幼胚的组织转移到再生培养基

上（图 8. 2）。用深度大的培养皿，培养基不加任何生长调节剂，只含有 1 mg/L 双丙氨膦。每 2 周用同样的培养基进行继代，直到不再有新的再生苗长出。

（2）当幼苗的芽长到 2~3 cm，也形成根时，从培养皿中移出转移到含有 12 ml 愈伤诱导培养基的玻璃试管（Sigma C-5916）中。培养基不加任何生长调节剂，只含有 1 mg/L的双丙氨膦。

（3）当长根的幼苗长到试管顶部，就可以转移到土壤中。用长镊子轻轻地将幼苗从试管中移出，根部的组织培养基用水冲洗干净。

（4）将幼苗用同样的大麦生长介质种在直径为 5 cm 的盆中，幼苗上面盖一个有孔的塑料杯以保持湿度，直到幼苗在土壤中定植良好。

（5）当幼苗在土壤中扎根后，就可以采集叶片分析目的基因是否存在。双丙氨膦选择不像潮霉素选择那样（详见第 9 章“农杆菌介导的大麦转化方法”），一些非转化的植株也可能存活。

（6）快速简易的检测再生植株转化状态的方法是用叶片进行除草剂抗性测试［8］。

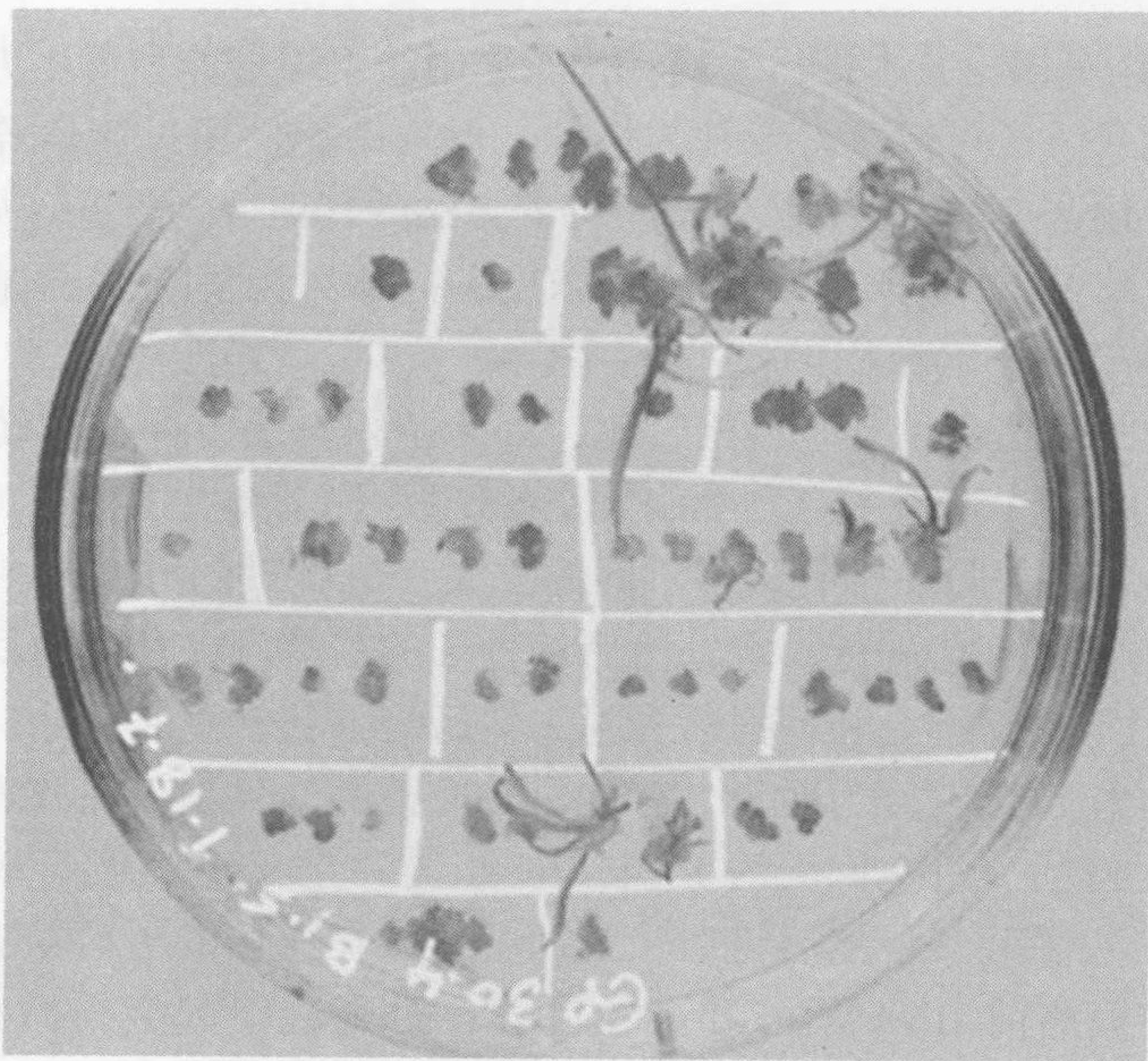


图 8. 2　在含有双丙氨膦除草剂 Bialaphos 的再生培养基上筛选转基因大麦。培养皿上部的愈伤在含有双丙氨膦 Bialaphos 的培养基上再生出了转化苗。用黑线分开的每个区域内的愈伤来源于同一个幼胚

3. 7　用基因枪进行瞬时检测

基因枪轰击的一个重要用途是进行瞬时分析，常用于稳定转化前对载体的检测。在瞬时分析时，装有幼胚的培养皿一般轰击两次以提高 DNA 的转化量，建议在两次轰击间以 90°角转动培养皿（见注 7）。图 8. 3（a）和图 8. 3（b）分别是用含有葡萄糖苷酸酶基因（*gus*）和绿色荧光蛋白基因（*gfp*）的金粉微粒轰击幼胚后进行瞬时表达的两个示例。

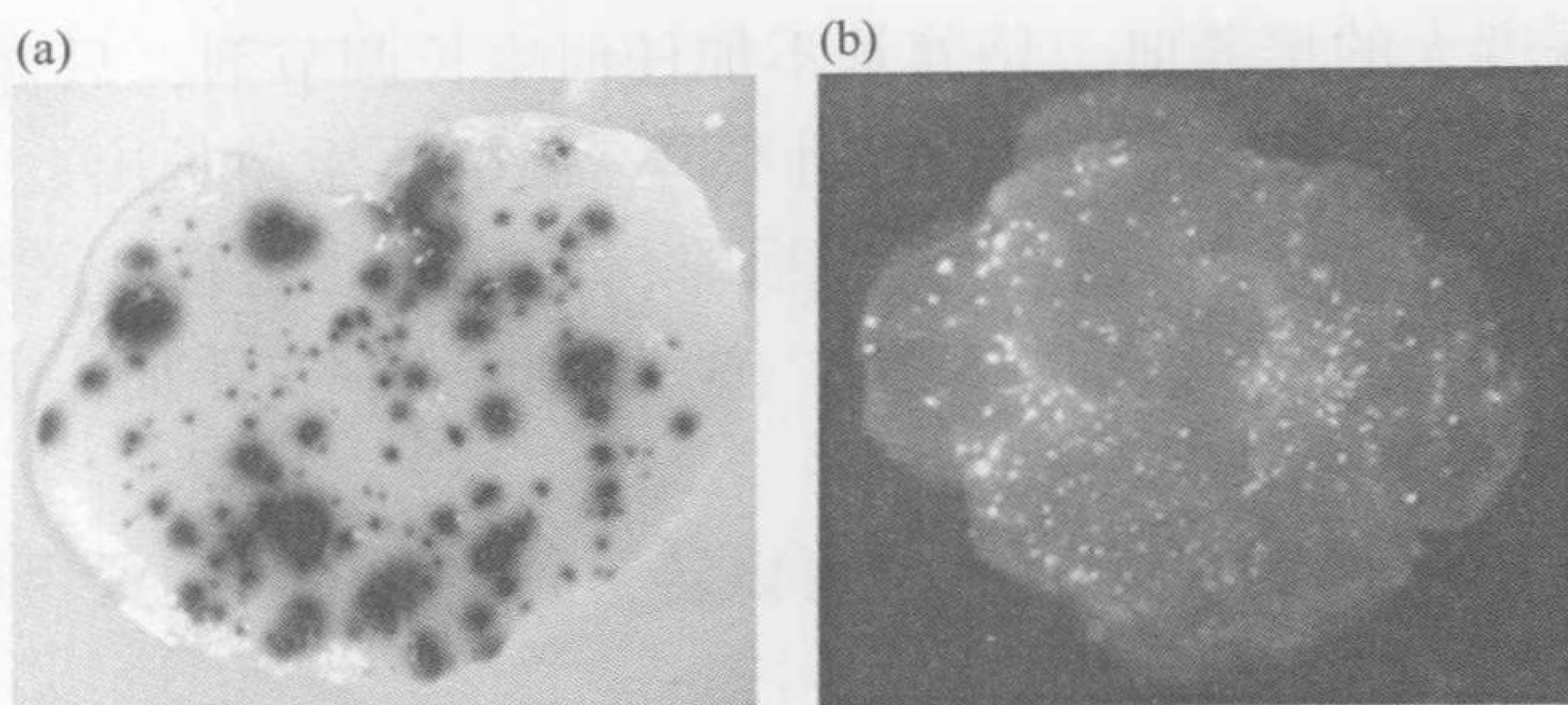


图 8.3　用基因枪法进行瞬时表达。(a) 用含有玉米泛素启动子驱动葡萄糖苷酸酶基因（*gus*）的质粒轰击大麦幼胚，幼胚在轰击后 2 天染色检测 GUS 的活性。(b) 用含有玉米泛素启动子驱动绿色荧光蛋白基因（*gfp*）的质粒轰击大麦幼胚，幼胚在轰击后 2 天观察 GFP 的荧光

4. 注释

注 1：早期运用基因枪技术进行大麦转化所采用的组织培养和再生方法中没有使用过渡培养基［2］。这种方法可以获得转基因植株，但效率比使用过渡培养基的要低。在农杆菌介导的大麦转化这一章中还介绍了组织培养方法的其他一些改进（见第 9 章）。

注 2：植物凝胶可以提前用水配成 2 倍浓度，高压灭菌后在室温保存，因为在其他培养基组分加入前它是不会凝固的。

注 3：小的幼胚更适合用于基因枪转化，因为基因枪法不存在因幼胚体积过小而使农杆菌过度生长的问题，但直径 1.5 mm 大小的幼胚还是最理想的。

注 4：剥离幼胚和去除胚轴有很多不同的方法。最有效的方法是一步法，即用一对细镊子将未成熟的种子打孔进行固定，然后从种子的芒端剥去种壳使幼胚裸露。一旦幼胚裸露，就可以用细镊子将上胚轴捏断去除，然后将下胚轴捏断去除，只留下完整无损伤的盾片。这个操作也可以分为两步。首先，将完整的幼胚剥离并放置在愈伤组织诱导培养基上，数量足够后，将它们大约 10 个为一组与一部分组织培养基一起放置在无菌平板上，用细镊子去除胚轴，然后将盾片正面朝上放在愈伤诱导培养基中。

注 5：在涡旋振荡前 DNA 不能和金粉混合，否则会引起金粉微粒的聚集。同样，如果亚精胺和 $CaCl_2$ 与金粉混合时涡旋振荡不彻底也会导致金粉的聚集。如果 DNA 浓度过高，金粉同样也会聚集，所以 DNA 的浓度测定非常重要，以避免过量。

注 6：空击是指不装终止屏、载体膜和靶组织，只在气体加速管基部的固定帽中放入一个破裂盘进行轰击。这一步用于在幼胚正式轰击前对基因枪气体通路的检查。

注 7：使用适配器可以增加基因枪单次轰击覆盖的区域（Hepta 适配器，Bio-Rad）。这种适配器可以同时安装 7 张点有金粉微载体的载体膜，同时用于一次轰击，所以可以覆盖培养皿更大的区域。在用小的靶组织如幼胚进行轰击时并不一定需要使用，但是在用大的靶组织进行瞬时表达研究时很有用。

（周　洁　严成其　译）

参考文献

1. Wan, Y. and Lemaux, P. G. (1994) Generation of large numbers of independent transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 104, 37-48.

2. Harwood, W. A., Ross, S. M., Cilento, P. and Snape, J. W. (2000) The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111, 67-76.

3. Yao, Q. A., Simion, E., William, M., Krochko, J. and Kasha, K. J. (1997) Biolistic transformation of haploid isolated micro-spores of barley (Hordeum vulgare L.). *Genome* 40, 570-581.

4. Zhang, S., Cho, M. -J., Koprek, T., Yun, R., Bregitzer, P. and Lemaux, P. G. (1999) Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinating seedlings. *Plant Cell Rep.* 18, 959-966.

5. Cho, M. -J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci.* 138, 229-244.

6. Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W. and Harwood, W. A. (2005) A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* 23, 780-789.

7. Agrawal, P. K., Kohli, A., Twyman, R. M. and Christou, P. (2005) Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Mol. Breed*. 16, 247-260.

8. Harwood, W. A., Ross, S. M., Bulley, S. M., Travella, S., Busch, B., Harden, J. and Snape, J. W. (2002) Use of the firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. *Plant Cell Rep.* 21, 320-326.

9. Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994) Fertile transgenic wheat from micro-projectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5, 299-307.

第9章　农杆菌介导的大麦转化方法

Wendy A. Harwood　Joanne G. Bartlett　Silvia C. Alves　Matthew Perry
Mark A. Smedley　Nicola Leyl　John W. Snape

摘　要：在过去10年中，农杆菌介导的大麦转化方法已被广泛运用，它在获得转基因植株的效率和质量方面，比基因枪介导的转基因技术更具有优势。本章介绍了一套简单的大麦转化系统，它通过在含潮霉素的培养基中筛选农杆菌侵染后的幼胚来获得转基因组织。这种方法可以产生大量可育的转基因独立株系，因此是进行禾谷类作物基因功能研究的理想方法。

关键词：大麦转化，农杆菌，转基因植物，潮霉素，幼胚

1. 前言

第一例大麦成功转化的报道是利用基因枪技术将DNA导入到幼胚［1］。同样，首次利用农杆菌获得转基因大麦植株的研究也使用了幼胚作为受体材料［2］。虽然其他受体材料也可以用于大麦转化，但幼胚仍为首选的原因是它具有更高的转化效率。另外一种农杆菌介导的大麦转化系统是用小孢子培养物作为受体材料［3］。比较基因枪法和农杆菌介导的大麦转化的研究，总结出农杆菌系统的一些优点［4］，包括较高的转化效率、较低的转基因拷贝数，以及更好的遗传稳定性和较少的基因沉默。

大麦转化非常依赖于基因型，最容易转化的基因型是春性大麦品种Golden Promise。也有报道用其他基因型进行农杆菌介导的转化，但是效率较低［5］。除了选择合适的受体组织和基因型，在农杆菌介导的转化系统中还有许多其他重要的影响因子，包括农杆菌的菌株类型、共培养条件和时间、筛选系统和再生系统等。农杆菌菌株AGL1或AGL0是大麦转化常用的菌株［6］，但用LBA4404也能成功转化。在许多关于大麦转化的报道中，通常用*bar*基因作为选择标记，它编码的蛋白质能使植株对草丁膦家族的除草剂具有抗性，可以用双丙氨膦或草胺膦进行筛选［4］。现已用潮霉素抗性基因*hpt*替代*bar*作为选择标记。潮霉素抗性基因可用CaMV 35S启动子启动，用于转基因大麦的筛选，留下强启动子如玉米的泛素启动子（*ubi*1）来启动目的基因或表达框。用于大麦转化的载体已构建了很多，本章我们使用pBract系列（http://www.bract.org）的载体进行转化，它们有很高的转化效率且操作简便，因为它们是Gateway系统兼容的载体，易于目的基因或序列的装载。

下面详细介绍农杆菌介导的大麦转化过程，包括从供体材料的种植到转基因植株鉴定的整个过程。

2. 材料

2.1　植物材料和生长条件

（1）将春性大麦品种 Golden Promise 的种子每隔 2 周播种在大麦生长介质中，生长介质由 Levington M3 混合物/珍珠岩/砂砾以 2∶2∶1 的比例混合组成，这种介质还包含少量缓释肥料奥绿肥，浓度为生产商推荐。

（2）种子最初播种于直径 5 cm 的圆盆中，大约 30 天后将发芽的植株转入直径 13 cm的圆盆中，采用相同的生长介质继续种植。

（3）植株生长在环境可控的温室内，白天温度 15℃，夜间温度 12℃，相对湿度 80%，用装有钨丝灯泡的金属卤化物灯（HQI）提供照明，使成熟植物冠层的光照强度为 500 μmol/(m^2·s)［8］（见注 1）。

2.2　农杆菌菌株和载体

（1）农杆菌菌株 AGL1 要与合适的 pBract 载体一起使用。这里我们使用载体 pBract 204，这个载体左边界有 35S 启动子启动的潮霉素抗性基因 *hpt*，右边界有玉米泛素启动子启动的 β-葡萄糖醛酸酶基因 *gus*（图 9.1）（见注 2）。

（2）pBract 载体是基于 pGreen 载体发展而来的一个小体积、高拷贝数的多用途载体，便于在大肠杆菌中操作［9］。为了使 pGreen 载体体积小，在农杆菌中复制必需的 pSa 复制起始位点，被分成两个不同的功能元件。复制起始点 ori 存在于 pGreen 载体中，而复制酶（RepA）基因作为反式作用因子存在于另一载体中，命名为 pSoup。这两个载体是 pGreen 在农杆菌中复制所必需的。

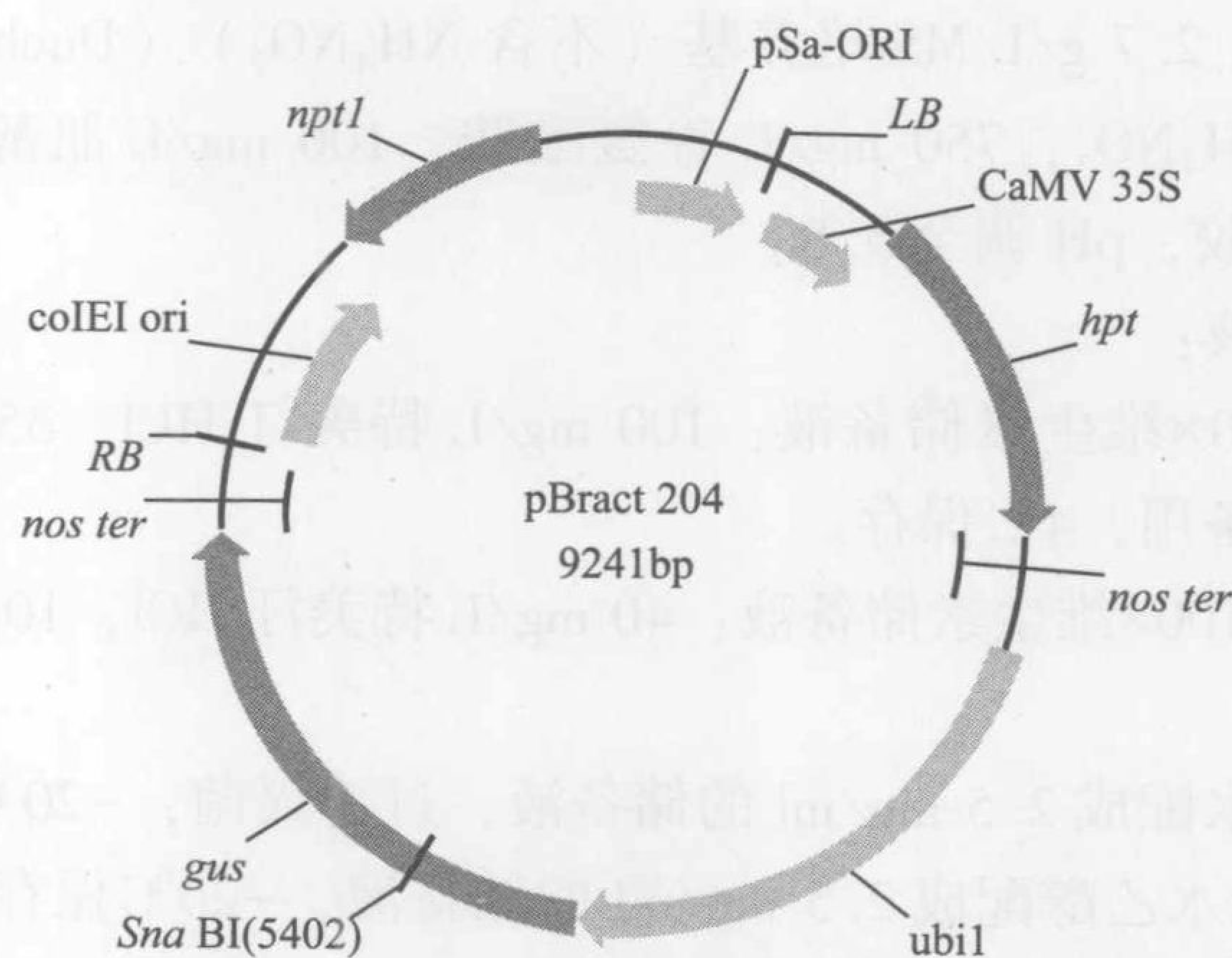


图 9.1　pBract 204 是基于 pGreen 的质粒，其左边界有 CaMV（烟草花叶病毒）35S 启动子启动的潮霉素抗性基因 *hpt*（*Hyg*），右边界有玉米泛素启动子（Ubi1）启动的 β-葡萄糖醛酸酶基因 *gus*

2.3　细菌培养基

基本的细菌培养基是 MG/L 培养基［10］，包含 5.0 g/L 胰蛋白胨、5.0 g/L 甘露醇、2.5 g/L 酵母提取物、1.0 g/L L-谷氨酸、250 mg/L KH_2PO_4、100 mg/L NaCl、100 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 10 μl 生物素（0.1 mg/L 母液）。用 NaOH 调 pH 至 7.2。固体培养基加 15 g/L 琼脂粉。

2.4　植物组织培养基

在转化和再生过程中，采用了三种不同的基本植物组织培养基：愈伤组织诱导培养基、过渡培养基和再生培养基。在所有筛选阶段，培养基中加入终浓度为 50 mg/L 的潮霉素（浓度为 50 mg/ml 的潮霉素 B 无菌母液由 Roche 公司提供），同时，在筛选培养基中加入终浓度为 160 mg/L、含有羟基噻吩青霉素和克拉维酸的抗生素（Duchefa T0190）（也称为特美汀）。在愈伤诱导和转化阶段，培养基中另外添加 1.25 mg/L 的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$。如无特殊说明，所有培养基成分均购自 Sigma 公司，培养基和试剂配制所需的水皆由 Elga 纯水仪制备。

（1）愈伤诱导：4.3 g/L MS 培养基（Duchefa M0221）包含 30 g/L 麦芽糖、1.0 g/L 水解酪蛋白、35 mg/L 肌醇、690 mg/L 脯氨酸、1.0 mg/L 特美汀 HCl、3.5 mg/L 麦草畏（Sigma-Aldrich D5417）、3.5 g/L 植物凝胶，用 NaOH 调 pH 至 5.8。

（2）过渡培养基：2.7 g/L MS 培养基（不含 NH_4NO_3，Duchefa M0238），20 g/L 麦芽糖，165 mg/L NH_4NO_3，750 mg/L 谷氨酰胺，100 mg/L 肌醇，0.4 mg/L 特美汀 HCl，2.5 mg/L 2，4-D（Duchefa），0.1 mg/L BAP（Duchefa），3.5 g/L 植物凝胶，pH 调至 5.8。

（3）再生培养基：2.7 g/L MS 培养基（不含 NH_4NO_3）（Duchefa M0238），20 g/L 麦芽糖，165 mg/L NH_4NO_3，750 mg/L 谷氨酰胺，100 mg/L 肌醇，0.4 mg/L 特美汀 HCl，3.5 g/L 植物凝胶，pH 调至 5.8。

（4）培养基储备液：

（a）愈伤诱导 100×维生素储备液：100 mg/L 特美汀 HCl，35 mg/L 肌醇，69 g/L 脯氨酸。过滤灭菌后备用，4℃保存。

（b）过渡和再生 100×维生素储备液：40 mg/L 特美汀 HCl，10 g/L 肌醇。过滤灭菌后备用，4℃保存。

（c）麦草畏：用水配成 2.5 mg/ml 的储备液，过滤灭菌，-20℃冷冻储存。

（d）2,4-D：用无水乙醇配成 2.5 mg/ml 的储备液，-20℃保存。

（e）BAP：用水加少量 1 mol/L NaOH 配成 1 mg/ml 储备液，-20℃保存。

（f）$CuSO_4$ 储备液：125 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 溶于 100 ml 水，过滤灭菌，4℃保存。

（g）潮霉素：将购买的 50 mg/ml 的潮霉素无菌母液分装成每管 1 ml，-20℃冷冻储存。

（h）特美汀：用水配成 160 mg/ml 的储备液，分装成每管 1 ml，-20℃冷冻储存。

2.5　其他设备

（1）5 号镊子（TAAB Laboratories Equipment Ltd. Ref. T083）

（2）双目显微镜（如 Leica MZ6）

3. 方法

3.1　组织培养基的准备

提前准备好所需浓度 2 倍的植物凝胶，高压灭菌（见注 3）。所有的组织培养基都要过滤灭菌，因此除了无菌的储备液，其他培养基成分按所需浓度 2 倍的量混匀，调到合适的 pH 后，过滤灭菌（使用瓶顶过滤器，0.22 μm 微孔滤膜，Millipore）。使用前将 2×凝胶和 2×培养基在水浴锅中加热至 60℃。将所需储备液在无菌条件下加入到热的培养基中，培养基和植物凝胶混合后倒入 9 cm 培养皿中（Sterilin）。分化培养时，将培养基倒入较深的组织培养皿中（100mm×20mm，Falcon）。

3.2　根瘤农杆菌接种前的准备工作

（1）标准接种液制备采用文献［2］中介绍的方法，稍作修改。

（2）挑取一个含有 pBract 质粒和 pSoup 质粒的 AGL1 农杆菌单克隆，接种于 10 ml 含 25 μg/ml 利福平和 50 μg/ml 卡那霉素的 MG/L 培养基中，于 28℃、180 r/min 振荡培养 40 h。

（3）将 10 ml 无菌的 30% 甘油加入细菌悬浮液中，颠倒混匀数次。

（4）将 400 μl 标准接种液分装于 0.5 ml 的离心管中，室温放置 2 h，每 30 min 颠倒混匀一次。

（5）将标准接种液置于−80℃储存。

3.3　分离大麦幼胚

3.3.1　幼穗的收采与消毒

（1）当幼胚直径长到 1.5~2 mm 时采收麦穗（见注 4）。

（2）在剪取麦穗之前，从每穗中间取一粒种子，检查幼胚的大小，确保达到要求［图 9.2（a）~（c）］。

（3）取下成熟种子，去芒，但不要破坏种壳。

（4）先用 70% 乙醇消毒 30 s，再用无菌水冲洗 3 次。

（5）在次氯酸钠（次氯酸钠溶液，Fluka 71696）与水比例为 50 : 50 的溶液中浸泡 4 min。

（6）用无菌水洗涤 4 次后，将水倒掉但保持种子湿润，置于无菌的螺口瓶中待用。

3.3.2　分离幼胚并移除胚轴

（1）所有的操作均在无菌操作台上进行。

（2）每次大约取 20 粒消毒过的种子置于解剖镜无菌的蓝色或黑色底板上。

（3）用一只镊子固定种子，另一只镊子剥出幼胚，去除胚轴（见注 5）［图 9.2（c）~（d）］。

（4）幼胚盾片朝上，置于愈伤组织诱导培养基上。

（5）每个直径 9 cm 的培养皿放 25 枚幼胚，准备接种农杆菌，23~24℃暗培养。

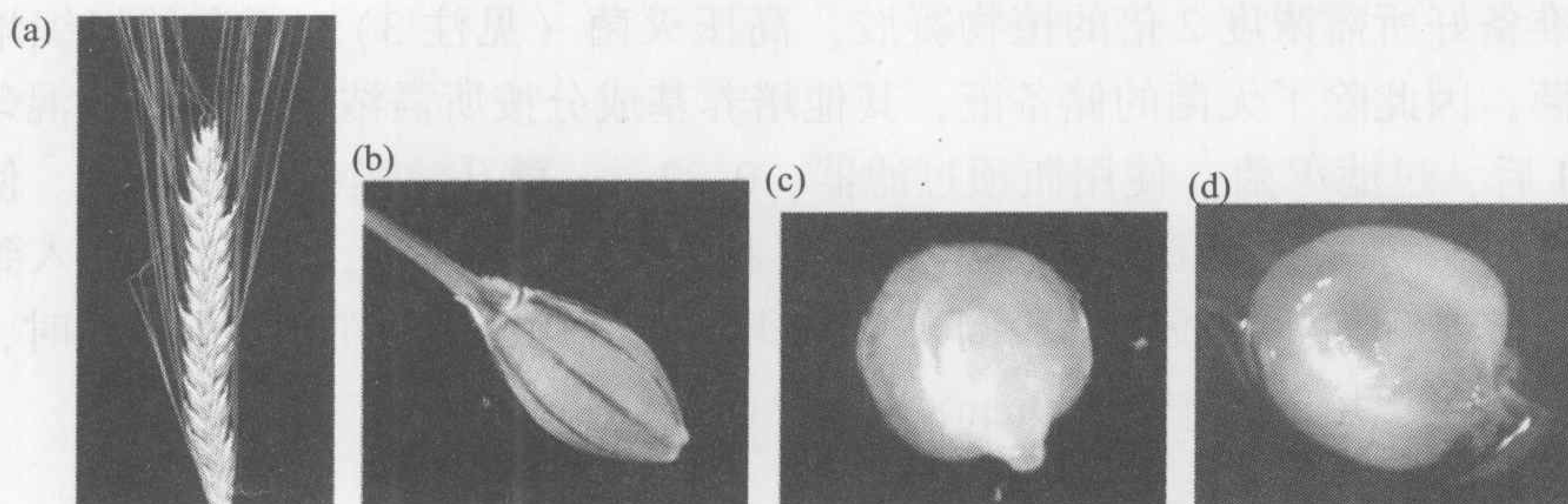


图 9.2　选择大麦麦穗和幼胚的最佳时期。（a）含有幼胚的大麦麦穗。（b）含有幼胚的未成熟种子。（c）从未成熟种子中分离出完整的幼胚。（d）移除胚轴后的幼胚，用于农杆菌的接种（见图版）

3.4　农杆菌的准备、接种与共培养

（1）将农杆菌标准接种液加入 10 ml MG/L 液体培养基中，不加抗生素，28℃下 180 r/min 培养过夜（大约 20 h）。

（2）用农杆菌培养液原液接种幼胚。

（3）用 200 μl 的移液枪将少量农杆菌滴在每个幼胚上，使其刚好覆盖幼胚的表面。

（4）处理完一个培养皿中的 25 个幼胚后，将培养皿倾斜，使幼胚上多余的农杆菌流出。

（5）每次最多接种 2 个培养皿的幼胚，然后将幼胚小心转移至另一个新鲜的诱导培养基上，盾片朝下。

（6）注意不要将多余的培养基或农杆菌带入新的培养基，必要时可将幼胚轻轻地在培养基上划动以去除多余的农杆菌再转入新的培养基。

（7）用医用胶带将培养皿密封，23~24℃培养 3 天。第一天分离幼胚、第二天接种比较方便，当然也可以在分离幼胚当天接种（见注 6）。

3.5　转化子的筛选

（1）共培养 3 天后，将幼胚转移至含有潮霉素和特美汀的愈伤组织诱导培养基中，潮霉素用于选择培养，特美汀用于抑制农杆菌（见注 7）。

（2）幼胚盾片朝下，23~24℃黑暗培养。该步骤称为选1。

（3）2周后，将胚转移至新的选择培养基上（选2）。同一个幼胚及其长出的愈伤组织作为一个整体进行转移，不要分开。

（4）继续培养2周后，将胚转移至新的选择培养基上（选3）（见注8），在这一时期，愈伤会从胚上脱落，将其放在该胚周围并做好标记，以便追踪来源于同一个幼胚的所有愈伤组织的生长情况。

（5）减少每皿胚的数量，因为胚来源的抗性愈伤将开始快速生长。

（6）在愈伤组织诱导培养基上选择培养6周后，将愈伤组织转移至含有潮霉素和特美汀的过渡培养基上。于24℃、弱光下培养2周，即把培养皿放到有光照的组织培养室中，用薄纸片将培养皿盖住以获得较暗的光线。经过这两周的培养之后，转化的愈伤可明显区分且开始出现绿色区域和小的嫩芽。未转化的愈伤在含潮霉素的培养基上几乎不分化。

3.6　转基因植株的再生

（1）在过渡培养基上培养2周后，最终将胚性组织转移至再生培养基上，用高的培养皿，培养基不加任何生长调节剂，但含有相同浓度的潮霉素和特美汀。

（2）由于转化的愈伤会长得非常快，需进一步减少每个培养基中的愈伤数。

（3）典型再生中的愈伤形态见图9.3（a）和图9.3（b）所示。同一幼胚来源的再生愈伤要放在一起。

（4）当幼苗的芽长至2~3 cm，也形成根时，从培养皿中移出，转移到含有12 ml愈伤组织诱导培养基的玻璃试管（Sigma C-5916）中，该培养基不加麦草畏或其他生长调节剂，但仍需加相同浓度的潮霉素和特美汀。

（5）转移至试管中生长的植株如图9.3（c）和图9.3（d）所示。转基因植株在含有潮霉素的生根培养基中能很快形成强壮的根系。

（6）在含有潮霉素的培养基中能形成强壮根系的植株，往往都是转化成功的，用这种筛选方法不会有逃逸或非转化的植株存活下来（见注9）。

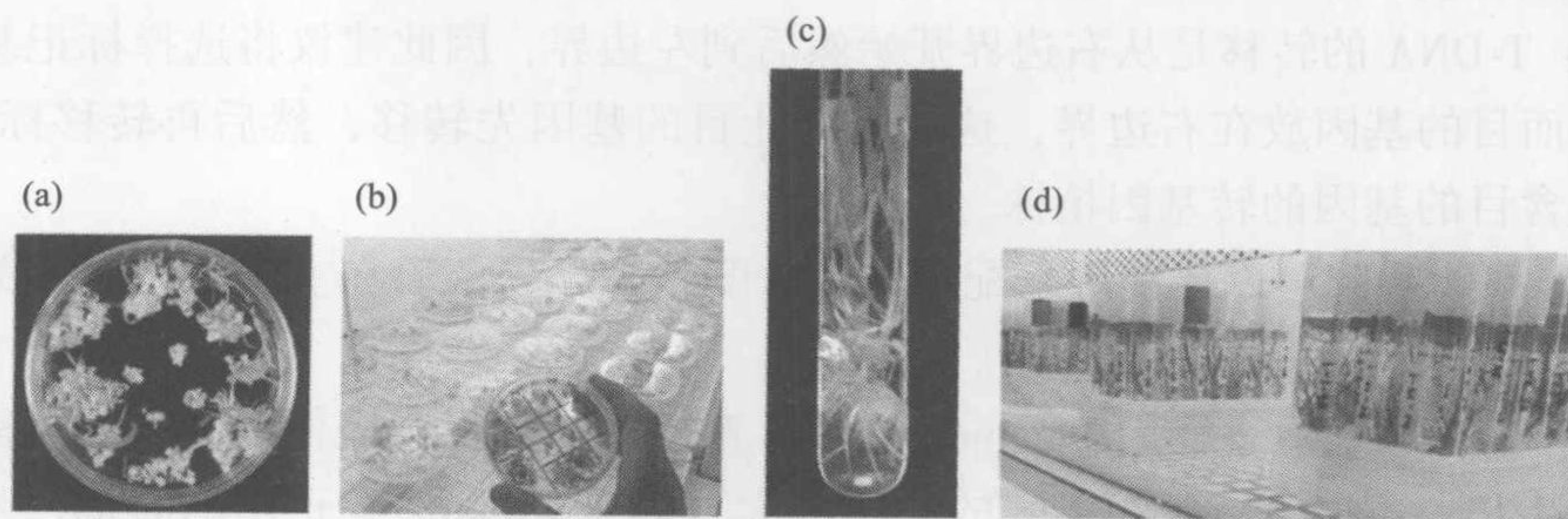


图9.3　用含潮霉素的培养基筛选转基因大麦。（a）再生培养基上，转化的愈伤排列在培养皿的边缘，未转化的愈伤在中间。（b）已转化大麦愈伤的继代培养。4个已转化愈伤的株系，对来自不同胚的愈伤进行标记。（c）转基因大麦植株在含潮霉素的生根培养基中根系生长良好。（d）温室中待移栽至土壤的转基因大麦幼苗（见图版）

(7) 当生根的植株长至试管顶部，便可将其转移至土壤中。

(8) 用长镊子轻轻地将幼苗从试管中移出，根部的组织培养基用水冲洗干净，种植于直径 5 cm、装有相同大麦生长介质种的盆中。

(9) 幼苗可单独用有孔的小塑料杯罩住或整盆用盖子罩住以保持湿度，直至幼苗在土壤中定植良好。

(10) 当幼苗在土壤中扎根后，就可以取叶片分析目的基因是否存在。图 9.4 显示转基因植株叶片中 *gus* 基因的表达情况。

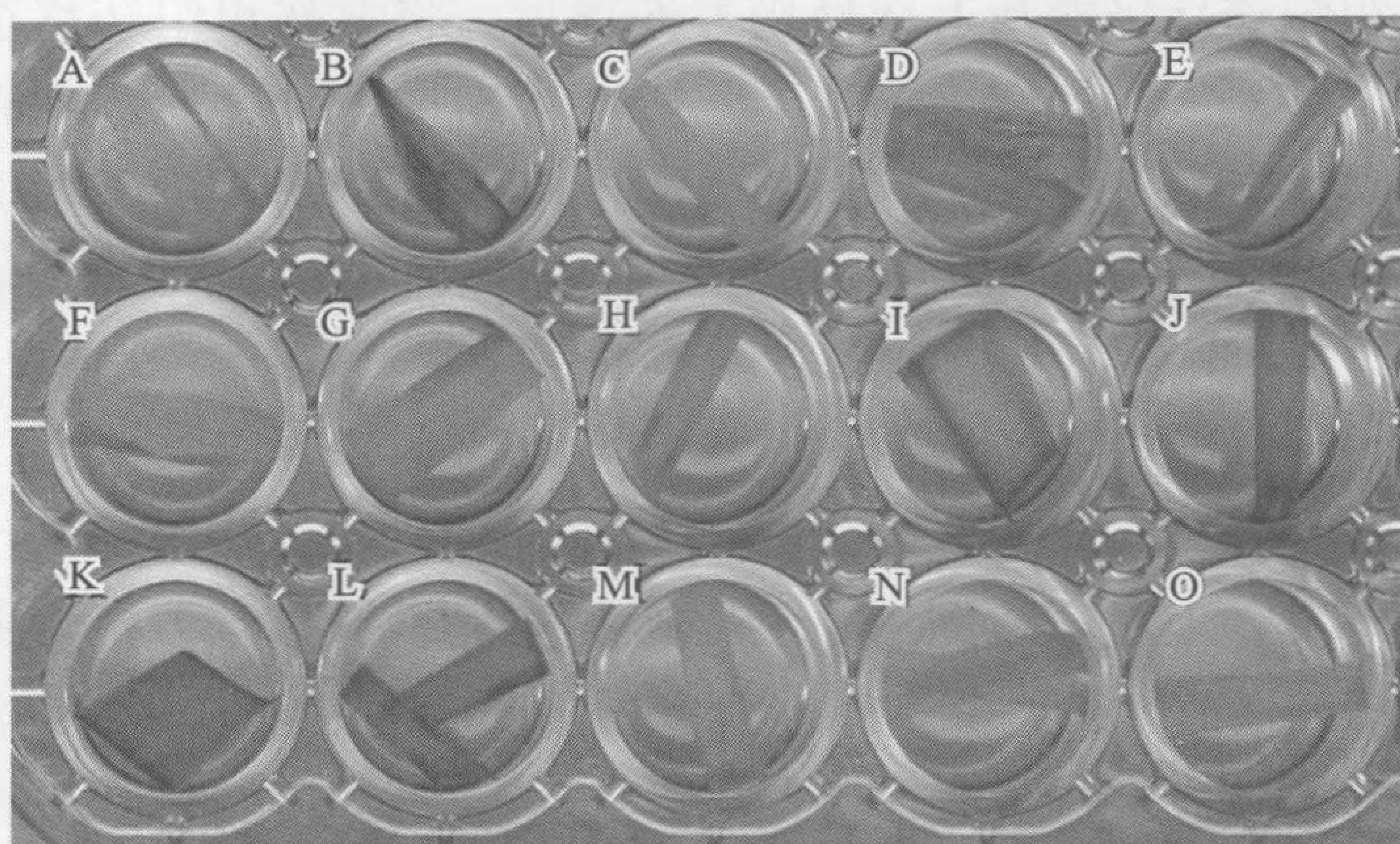


图 9.4　转化 pBract204 载体后叶片 GUS 活性的组织化学染色结果。A 和 F 孔中的样品无 GUS 染色，其他孔中的样品 *gus* 基因均有不同程度的表达（见图版）

4. 注释

注 1：用于提供幼胚做转化的植株不能喷洒农药，尤其要避免在开花前喷洒农药，这样容易降低幼胚对组织培养的反应。

注 2：T-DNA 的转移是从右边界开始然后到左边界，因此建议将选择标记基因放在左边界，而目的基因放在右边界，这样可以让目的基因先转移，然后再转移标记基因，以增加包含目的基因的转基因植株。

注 3：植物凝胶可以提前用水配成 2 倍浓度，高压灭菌后在室温保存，因为在其他培养基组分加入前它是不会凝固的。

注 4：幼胚的最适直径为 1.5 mm。1 mm 直径的幼胚很难操作，并且很可能会使农杆菌过度生长。可以进行组织培养的幼胚最大直径是 2 mm。在正确的时期，未成熟种子的胚乳看起来应该是柔软多汁的。如果胚乳看起来是粉状的，那可能太老了。

注 5：剥离幼胚和去除胚轴有很多不同的方法。最有效的方法是一步法，即用一对细镊子将未成熟的种子打孔进行固定，然后从种子的芒端剥去种壳使幼胚裸露。一旦幼胚裸露，就可以用细镊子将上胚轴捏断去除，然后将下胚轴捏断去除，只留

下完整无损伤的盾片。这个操作也可以分为两步：首先，将完整的幼胚剥离并放置在愈伤组织诱导培养基上，数量足够后，将它们大约10个为一组与一部分组织培养基一起放置在无菌平板上，用细镊子去除胚轴；然后，将盾片正面朝上放在愈伤组织诱导培养基中。

注6：无论是在分离当天侵染幼胚，还是在分离后一天侵染幼胚，转化效率都为25%。转化效率以独立转化的植株数与用于转化的幼胚数的百分比来统计。

注7：采用以上所介绍的操作方法，可以避免农杆菌在幼胚上过度生长。如果共培养后农杆菌在幼胚上过度生长，那么这些幼胚就应丢弃不用，用过小的幼胚就会遇到这种情况。

注8：如果愈伤组织在筛选后4周看起来很好，那就可以省略在愈伤组织培养基上最后2周的筛选，而直接转移到过渡培养基上。如果不能确定愈伤生长好坏，就继续培养2周，这样结果会更好。

注9：尽管未转化的植株通常不能在潮霉素培养基中存活和生根，但有时候也会有两个不定芽长在一起，一个是转化子，另一个是非转化子。这些芽可能被同时转移到试管中，将植株移出试管清洗根部准备种植之前，通常是很难发现的，这种情况可能是转化的植株维持了非转化植株的生长而造成的。

（周　洁　严成其　译）

参考文献

1. Wan, Y. and Lemaux, P. G. (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 104, 37-48.
2. Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S. and Brettell, R. (1997) Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. *Plant J.* 11, 1369-1376.
3. Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hansel, G., Becker, D. and Lorz, H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* 4, 251-261.
4. Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W. and Harwood, W. A. (2005) A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* 23, 780-789.
5. Wang, M. -B., Abbott, D. C., Upadhyaya, N. M., Jacobsen, J. V. and Waterhouse, P. M. (2001) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 149-156.
6. Matthews, P. R., Wang, M. B., Waterhouse, P. M., Thornton, S., Fieg, S. J., Gubler, F. and Jacobsen, J. V. (2001) Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent "twin T-DNAs" on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Mol. Breed.* 7, 195-202.
7. Shrawat, A. K., Becker, D. and Lorz, H. (2006) Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Sci.* 172, 281-290.
8. Harwood, W. A., Ross, S. M., Cilento, P. and Snape, J. W. (2000) The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vul-*

gare). *Euphytica* 111, 67-76

9. Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation *Plant Mol. Biol.* 42, 819-832.

10. Garfinkel, M. and Nester, E. W. (1980) Agrobacterium tumefaciens mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J. Bacteriol.* 144, 732-743.

第10章 燕麦转基因及其在提高渗透胁迫耐受中的应用

Shahina B. Maqbool Heng Zhong Hesham F. Oraby Mariam B. Sticklen

摘 要： 燕麦（*Avena sativa* L.）是一种在全球广泛种植的温带禾谷类作物，对干旱和/或高盐造成的渗透胁迫缺乏耐受能力。为了实现对现有商业化的燕麦栽培品种的遗传转化，我们建立了一套不受基因型影响的高效茎尖分生组织再生体系，4个燕麦品种Prairie、Porter、Ogle和Pacer都能在体外高效地从茎尖分生组织分化出再生苗。应用这一再生体系，我们用基因枪对3个燕麦品种进行了质粒pBY520（带有*hva*1和*bar*）和pAct1-D（带有*gus*）的共转化。用除草剂抗性和GUS作为标记，选择转基因阳性株系。用分子和生化的方法分析可能的转基因阳性株系，发现其中100%的植株带有*hva*1和*bar*基因，61.6%的植株同时带有三个基因（*hva*1、*bar*和*gus*）。进一步分析R_0、R_1、R_2代转基因植株，显示三个基因都已稳定地整合到基因组中，其分离比符合孟德尔遗传。组织化学分析显示，在维管组织和成熟颖花的花粉粒中GUS表达水平较高。免疫化学分析显示*hva*1在各个发育时期组成型表达，不过在苗早期表达水平较高。

我们分析了燕麦转基因后代HVA1的表达对其体内及体外渗透胁迫耐受性的影响。转基因燕麦对胁迫条件的耐受性要明显高于非转基因燕麦（$P<0.05$）。在渗透胁迫条件下，80%的非转基因植株表现出叶片枯萎和死亡的症状，而这种症状的出现在转基因植株中明显滞后，且只在不到10%的叶片出现。这些结果证实了HVA1蛋白提供或提高了转基因植株对于盐和缺水造成的渗透胁迫的耐受性。

关键词： 燕麦（*Avena sativa* L.），*hva*1，*bar*，*gus*，茎尖分生组织，转基因，后代，渗透胁迫

1. 引言

燕麦（*Avena sativa* L.）是一种冷季型一年生禾谷类作物，其全球产量位于小麦、玉米、水稻、大麦、高粱和小米之后，为世界第七大禾谷类作物。不同于其他禾谷类作物，绝大多数的燕麦在国内流通消耗，只有少量出口贸易［1,2］。燕麦喜好较冷和潮湿的气候，能够在不同类型的土壤上生长［3,4］。其生长相比小麦和大麦来说，能适应更大范围的土壤pH，如pH从5.5~7.0，有些燕麦品种甚至可以在pH4.5的土壤上生长。另外，燕麦种植的土壤石灰施用量很低［5］，但是其生长和结实需要充足的水分。因此，俄罗斯、加拿大、美国、芬兰和波兰是主要的燕麦生产国［6］。而燕麦最高的产量一般来自新西兰、瑞士、德国、英国、爱尔兰、瑞典和法国等国［7］。

因为燕麦的蛋白质和必需矿物质含量高，几个世纪以来，一直是优良的家畜饲料

[8]。另外，燕麦的高纤维含量能促进消化 [6]。燕麦也可用于食品加工，如燕麦片、燕麦淀粉和饼干。近来燕麦和燕麦麸作为健康食物也大受欢迎，因为其能够帮助减少血液中的胆固醇，并且能够调节胃肠功能 [6]。最近燕麦更是被用于化妆品生产，因为其含有两种活性成分——燕麦生物碱和 β-葡聚糖。这两种物质有利于保护皮肤，用于抵抗刺激物和帮助晒伤的皮肤再生等。燕麦还可用于造纸和酿造工业，以及用来生产塑料、杀虫剂和防腐剂 [7]。燕麦还可作为饲料、牧草，用于生产绿肥，或作为作物覆盖物。作为作物覆盖物时，燕麦能够延长土壤使用寿命，抑制杂草生长，控制土壤的侵蚀和增加有机成分 [4,8]。以上原因直接导致了对优质燕麦需求的增加。

环境胁迫，如干旱和盐碱，限制了全球农业产量 [9,10]。尤其是盐碱，影响了全球约 1/3 的灌溉农业用地 [11,12]。由于不合理的耕作，世界可耕地面积正在逐渐减少 [13]。这使得农民不得不在容易发生盐碱的地区种植和收获受盐胁迫的农作物 [14]。燕麦对高温和干旱的气候很敏感，其产量依赖于生长季节中供水量是否充足 [15]。燕麦对盐胁迫的适应性还知之不多，但一般认为其对盐胁迫的耐受性要比其他的谷类或饲料作物低 [16]。有报道称盐害能够降低不同燕麦品种种子的萌发率和影响萌发后的生长 [16,17]。倒伏是影响燕麦产量的另一个因素。同时，燕麦也易受大麦黄条矮缩病毒和有害昆虫的影响 [18,19]。人们已经对燕麦品种进行了改良，以提高其抗病性，但规模有限 [20]。

由于不同燕麦品种间基因组背景的保守性及低效的选育方法，人们难以通过传统育种手段来解决燕麦生产中的问题 [21]。但是，现代作物改良策略，如生物技术，可以与传统育种手段相结合来促进农业增产 [22~24]。生物技术作为一种具有良好前景的方法，不仅可解决发展中国家面临的有限的作物产量的问题，而且能促进可持续农业的发展 [25,26]。因此，选择具有高产遗传潜力的品种，或通过遗传工程手段培育抗性品种，有助于提高胁迫条件下燕麦的产量水平。

最近，禾谷类作物的改良得益于组织培养和优良性状基因的遗传工程改良 [27~29]。但是，关于不受基因型影响的燕麦体外再生和基因工程体系的研究报道仍然有限 [29~34]。1996 年，张等发展了一种不受基因型影响的高效的茎尖分生组织再生体系，可用于商业化燕麦品种的遗传转化 [35]。其后的研究报道了基因枪介导的转化体系，应用成熟胚来源的愈伤 [36,37]、幼苗叶基部 [38] 和未成熟胚来源的胚性愈伤组织作为受体进行遗传转化 [39]。但是，胚源性愈伤不适于常规的燕麦转化，因为延长组织培养时间可能造成体细胞无性系的变异 [40,41]。因此，来自成熟种子的多芽分生组织，可作为另一种不受基因型影响的具有再生能力的受体组织，用于商业化燕麦品种的遗传转化 [35~47]。采用这一体系，可以高效地进行组织再生且重复性好，获得的转基因植株具有很高的结实率和基因组稳定性。

这里，我们介绍了茎尖分生组织结合基因枪介导，对三个燕麦品种进行遗传转化的方法，以及利用该方法转化抗渗透胁迫基因 *hva*1，提高燕麦对渗透胁迫的耐受性。此外，我们还介绍了对转基因燕麦的分子和生化分析，以证实转基因的整合，表达稳定并可遗传，同时检测了 *hav*1 基因在转基因植株中的表达及其对盐碱和缺水的耐受性的影响。

2. 材料

2.1 燕麦品种

（1）Ogle（Brave/2/Tyler/Egdoion23）

（2）Pacer（Coachman×CI 1382）

（3）Prairie（IL73-5743×Ogle）

2.2 质粒

（1）pBY520 包含两个基因：一个是来源于 *Streptomyces hygroscopicus* 的抗除草剂基因——草胺膦乙酰基转移酶基因（*bar*），作为选择标记，该基因由花椰菜病毒启动子（CaMV35S）驱动，以农杆菌胭脂氨酸合成酶基因（*nos*）的 3′非编码区为终止子。胁迫抗性基因来源于大麦（*Hordeum vulgare* L.）胚胎发生后期的富集蛋白基因（*Shva*1），由水稻肌动蛋白 Act1 的启动子驱动，以马铃薯蛋白水解酶抑制子Ⅱ（pinⅡ）的 3′非编码区为终止子（图 10.1）。

（2）pAct1-D：含有由 Act1 启动子驱动并利用 nos 终止子的大肠杆菌 β-葡萄糖醛酸酶基因（*gus*）（图 10.1）。

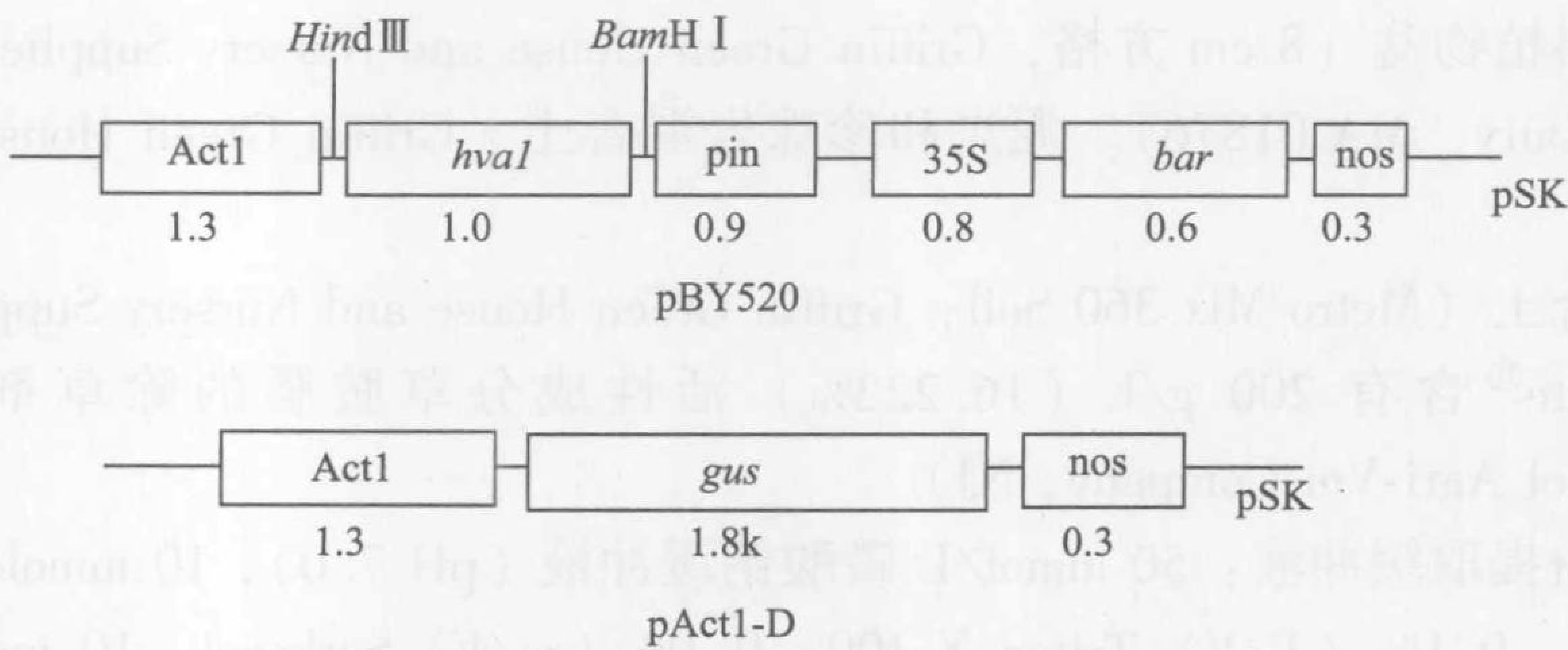


图 10.1　质粒 pBY520 和 pAct1-D 的结构示意图

2.3 培养基

（1）MS1（萌发培养基）：4.3 g/L MS［52］基本培养基和维生素（GIBCO BRL Rockville，Maryland），30 g/L 蔗糖（Sigma，St. Louis，MO，USA），3 g/L phytagel（Sigma），pH 5.6。

（2）MS2（芽增殖培养基）：MS 培养基，30 g/L 蔗糖，500 mg/L 酪蛋白酶水解物（Sigma），0.5 mg/L 2，4-D（Sigma），2 mg/L N_6-苄基腺嘌呤（Sigma），3 g/L phytagel，pH 5.6。

（3）MS3（粒子轰击培养基）：MS 培养基，30 g/L 蔗糖，500 mg/酪蛋白酶水解物（Sigma），0.5 mg/L 2，4-D（Sigma），2 mg/L N_6-苄基腺嘌呤（Sigma），5 g/L phytagel。

（4）MS4（低选择压的芽增殖培养基）：MS2 培养基，5 mg/L 草胺膦（Sigma）或 2 mg/L 双丙氨膦（Meiji Seika Kaisha，Japan）。

（5）MS5（高选择压的芽增殖培养基）：MS2 培养基，10 mg/L 草胺膦或 3 mg/L 双丙氨膦。

（6）MS6（芽再生培养基）：MS 培养基，20 g/L 蔗糖，0.5 mg/L N_6-苄基腺嘌呤，0.5 mg/L 吲哚三丁酸（Sigma），15 mg/L 草胺膦或 5 mg/L 双丙氨膦，3～5 g/L phytagel，pH 5.6。

（7）MS7（生根培养基）：2.15 g/L MS 培养基，10 g/L 蔗糖，15 mg/L 草胺膦或 5 mg/L 双丙氨膦，3~5 g/L phytagel，pH 5.8。

（8）MS8（盐胁迫培养基）：2.15 g/L MS 培养基，10 g/L 蔗糖，100 mmol/L NaCl（Sigma），3~5 g/L phytagel，pH 5.8。

（9）MS9（渗透胁迫培养基）：2.15 g/L MS 培养基，10 g/L 蔗糖，200 mmol/L manifold（Sigma），3~5 g/L phytagel，pH 5.8。

所有的培养基需 121℃高压蒸汽灭菌 20 min。激素、除草剂和抗生素在培养基灭菌后添加（40~50℃）。

2.4 其他材料

（1）Clorox 漂白剂（Clorox Professional Products Company，Oak-land，CA 94612）

（2）塑料植物盆（8 cm 方格，Griffin Green House and Nursery Supplies，1619 Main Street，Tewksbury，MA 01876）。泥炭和珍珠岩混合土（Griffin Green House and Nursery Supplies）。

（3）混合土（Metro Mix 360 Soil；Griffin Green House and Nursery Supplies）

（4）Ignite® 含有 200 g/L（16.222%）活性成分草胺膦的除草剂（1% Ignite Hoechst-Roussel Agri-Vet Company，NJ）

（5）蛋白提取缓冲液：50 mmol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.0），10 mmol/L EDTA（乙二胺四乙酸），0.1%（*V/V*）Triton X-100，0.1%（*m/V*）Sarkosyl，10 mmol/L 巯基乙醇，10 mmol/L PMSF（phenylmethylsulfonyl fluoride）。

（6）碱性磷酸酶缓冲液：100 mmol/L Tris-base，100 mmol/L NaCl，5 mmol/L $MgCl_2$（pH 9.8）含有 0.33 mg/ml NBT（Nitro blue tetrazolium），0.16 mg/ml BCIP（5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate）

（7）GUS 底物：10 mmol/L EDTA（pH 7.0），0.1 mol/L phosphate buffer（pH 7.0），1~5 mmol/L X-Gluc（X-Gluc 可以用二甲基亚砜溶解，Sigma）。

3. 方法

3.1 芽尖培养

（1）成熟的燕麦（Ogle、Pacer 和 Prairie）种子用于芽尖培养。

（2）徒手去除种子的外稃和内稃。

（3）种子用 70% 乙醇（Sigma）浸泡 5 min 进行表面消毒，然后用无菌蒸馏水洗一次，再用 20% 的 Clorox 漂白剂浸泡，并在旋转振荡器上以 0.5 *g* 持续振荡 30 min（VWR International，Bristol，CT 06011）（见注 1），用无菌蒸馏水洗三次。

（4）在无菌条件下将种子放入装有湿润滤纸的培养皿后，覆盖一层湿滤纸，将培养皿在 3~5℃ 放置 2~3 天以使种子适应处理条件。期间要经常加水保持湿度。

（5）放置结束后，将 10~12 粒经过消毒的种子放入倒有 MS1 培养基的（25 mL/每皿）无菌培养皿（100 mm×15 mm，直径×高；VWR）中萌发，在生长室或 25℃ 生长箱中暗培养一周（见注 2）。

（6）种子萌发后，用无菌的刀片（Sigma）将芽尖切成 3~5 mm 的小段（见注 3）。

（7）将 5~7 个切好的芽水平放置在倒有 MS2 培养基的培养皿中（100 mm×15mm），在 25℃ 持续光照条件下培养 4 周［60 μm/（m ^{2} · s）采用 40 W 功率的冷白光 Econ-o-watt 荧光灯管，Philips Westinghouse，USA］（见注 4）。

（8）每周进行一次继代培养，从培养的芽尖将伸长的叶片、胚芽鞘和茎移除，然后再切成 3~5 mm 的小段。

（9）每 2 周用 MS2 培养基进行继代培养以保持丛生芽的生长［图 10.2（a）］。

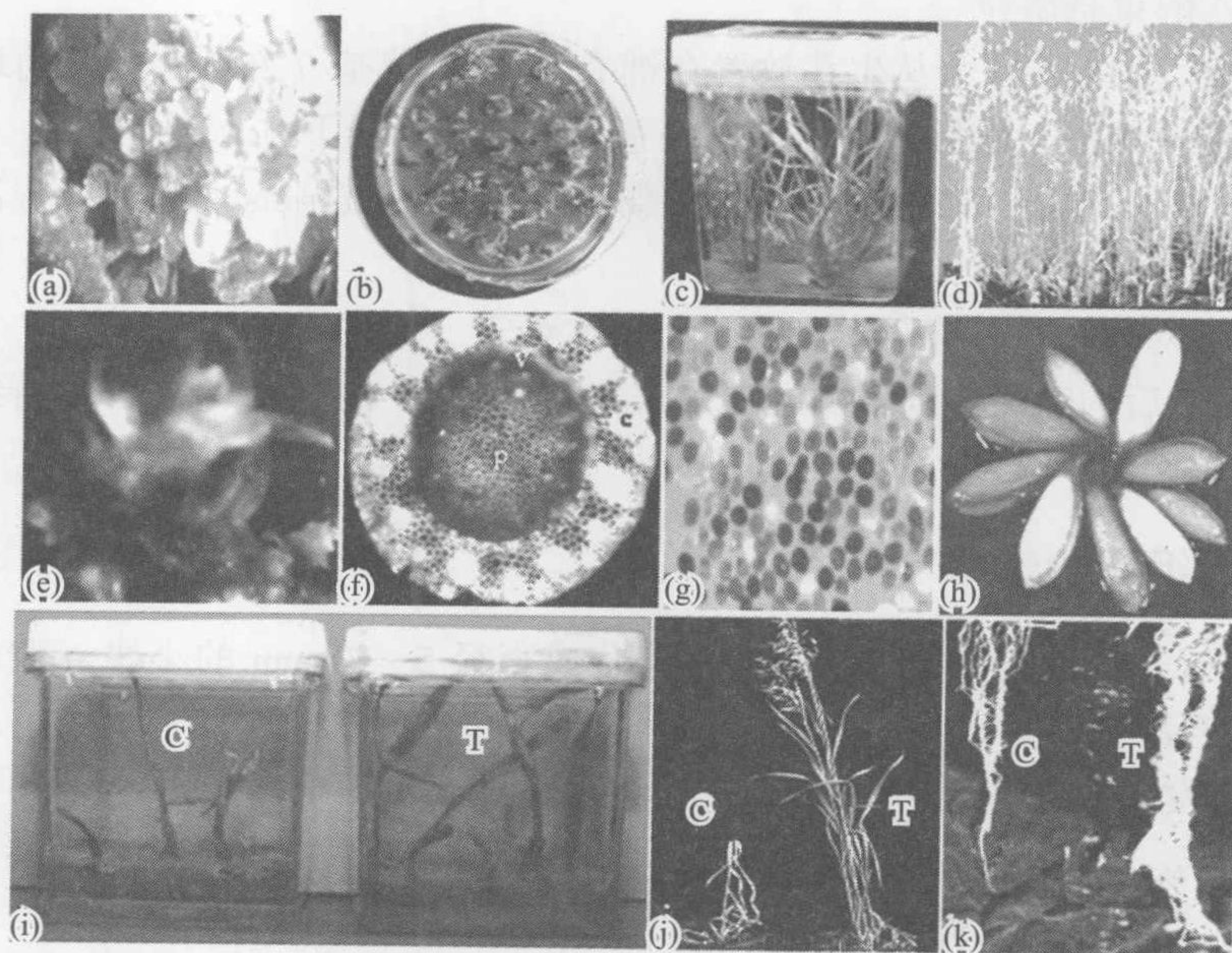


图 10.2　燕麦（*Avena sativa* L.）转基因。（a）培养 4 周的芽尖分生组织；（b）基因枪轰击两周后未经筛选的增殖芽；（c）在选择培养基上再生的转基因苗；（d）温室中成熟的转基因燕麦；（e）从生芽中 GUS 的表达；（f）茎横切片中 GUS 的表达模式；P，髓；V，维管束；C，皮层；（g）成熟花粉中的 GUS 表达；（h）种子中的 GUS 表达；（i）在盐胁迫（100 mmol/L）培养基中生长的燕麦幼苗；（j）用 150 mmol/L 盐溶液浇灌后的燕麦植株；（k）用 100 mmol/L 盐溶液浇灌后的燕麦的根；T，转基因；C，非转基因（见图版）

(10) 培养 8 周后计算每一品种丛生芽的相对分化频率，即产生丛生芽的芽尖数与培养的总芽尖数的百分比（见注 5）。

3.2 微粒轰击

(1) 取 30 mg 金粉（直径 1 μm；Bio-Rad，Richmond，CA，USA）或钨粉（直径 0.9 μm；GTE Sylvania，Towanda，PA，USA）置于 1.5 ml 离心管（VWR），加入 1 ml 100% 乙醇高速涡旋振荡 30min 进行消毒，用于基因枪轰击。

(2) 在振荡过程中，取 50 μl 微粒乙醇悬浮液到新的离心管中，并用微量离心机（Brinkman，Westbury，NY 11590）10 000 *g* 离心 30 s，然后加入 1 ml 蒸馏水，涡旋振荡洗涤并离心。洗两次后，用 332 μl 无菌蒸馏水重悬微粒。

(3) 在重悬的微粒中加入 15 μl DNA 样品，其中含有 15 μg 摩尔比为 1∶1 的 pBY520 和 pAct1-D 质粒、225 μl 的 2.5 mol/L $CaCl_2$（Sigma）、50 μl 0.1 mol/L 亚精胺（Sigma），室温下涡旋振荡 5 min（见注 6）。

(4) 将微粒-DNA 悬浮液在冰上放置 10 min，然后 10 000 *g* 离心 1 min。

(5) 用 500 μl 100% 乙醇清洗微粒-DNA 沉淀，涡旋振荡 30 s，离心 1 min，然后用 100 μl 100% 乙醇重悬微粒。

(6) 根据大小将 2~3 个丛生芽放置在铺有 MS3 培养基（25 ml/皿）的培养皿中直径为 1.5 cm 的区域内，然后将培养皿放在基因枪的终止屏下方（见注 7）。

(7) 吸取 10 μl 微粒-DNA 悬浮液加在载体膜（macrocarriers）中心，待乙醇挥发后立即用于轰击（见注 8）。

(8) 2 h 后对每一个芽尖培养物再进行一次轰击（见注 9）。

(9) 将轰击后的芽尖移到新鲜的 MS2 培养基上（25 ml/皿），在 25℃ 持续光照［60 μm/(m^2 · s)］条件下生长 4 周，期间进行一次继代培养［图 10.2（b）］。

3.3 转基因组织的选择

(1) 4 周后，将基因枪轰击过的丛生芽分成直径 5~10 mm 的小块（避免损伤芽分生组织），然后每皿放 6~8 个芽丛于 MS4 培养基上（25 ml/皿；100×15），并计算转基因事件的相对发生频率（表 10.1）。

(2) 2 周后，将转基因的芽（绿色的）在新鲜的 MS4 培养基上进行继代培养，去除非转基因的芽（黄色或褐色）。

(3) 在 MS4 上选择培养 4 周后，将绿色的丛生芽分成直径为 5~10 mm 的芽丛，在 MS5（25 mL/皿，100×20）培养基上继代生长 4~6 周。

(4) 经过总共 4 个月的选择和增殖后，将快速生长的丛生芽移至带有 MS6 培养基（50~70 ml/Magenta）的 Magenta 盒（99 mm×68 mm，长×直径，Sigma；2~3 芽丛/Magenta）中进行营养生长，然后移至 MS7（50~70 ml/Magenta）培养基中进行生根培养［图 10.2（c）］。

(5) 当转基因植株长到 5~10 cm 高、有 2~3 个叶片时，移植到含混合土的 8 cm 塑料罐中，其中泥炭和珍珠岩按 1∶1 混合，每罐一棵。在 16 h 光周期、70%~80% 湿度

的温室中生长直到成熟［图 10.2（d）；见注 10］。

（6）让转基因植株自花授粉结实，收种，按株系独立保存在 4℃ 和 70% 湿度的环境中。

表 10.1　基因枪轰击后丛生芽在选择培养基上的相对分化频率

品种	轰击的丛生芽个数	独立事件的个数[a]	转化频率/%[b]
Ogle	15	11	73.3
	16	13	81.2
Pacer	15	11	73.3
	18	15	83.3
Prairie	17	12	70.5
	12	10	83.3

a. 选择 1 个月后增殖的独立丛生芽总数；

b. 选择 1 个月后增殖的独立丛生芽总数除以轰击的丛生芽总数×100

3.4　转基因遗传分析

（1）低温处理后，种子（每皿 10~12 粒）在 MS7（25 ml/皿）培养基上萌发 1 周，用于分析转基因的遗传特性，如在 R_0、R_1、R_2 代中 *bar* 基因的遗传稳定性（见注 11）。

（2）或者在温室中，利用多孔塑料盘（Griffin Green House and Nursery Supplies）在土中（Metro Mix 360 Soil）萌发种子并生长 2 周。用除草剂喷洒生长的植株（见注 12）。

（3）1 周后，统计选择培养基上萌发和未萌发的种子数，或温室中除草剂处理后存活和死亡的植株数。

（4）采用 χ^2 检验（53）分析转基因在 R_0、R_1、R_2 代的分离（表 10.2）。

表 10.2　在 R_1 代转基因燕麦植株中的转基因遗传分析

转化	萌发种子	未萌发种子	χ^2	*P* 值*
Ogle BRA-17	70	20	0.37	0.54
Ogle BRA-19	60	15	1.00	0.32
Ogle BRA-41	89	26	0.33	0.56
Pc. BA-4	96	30	0.09	0.75
Pc. BA-10	159	61	0.87	0.35

* 观测值分离比与 3∶1 分离无显著差异（$P>0.05$）

3.5　转基因植株的分子检测

3.5.1　聚合酶链反应（PCR）

（1）转基因植株中转基因的检测（如 *bar* 和 *hav*1）：用叶片遵照 REDExtract-N-

Amp™ Plant PCR 试剂盒（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，Cat # XNA-P）的说明书操作提取 DNA。

（2）使用正向（F）和反向（R）PCR 引物：例如，*bar*-F：5′- ATG AGC CCA GAA CGA CG-3′；*bar* -R：5′-TCA GAT CTC GGT GAC GG-3′；*hva*1-F：5-TGG CCT CCA ACC AGA ACC AG-3′；*hva*1-R：5-ACG ACT AAA GGA ACG GAA AT-3′。

（3）在 PCR 仪（如 Per-kin Elmer/Applied Biosystem，Foster City，CA）上进行 DNA 扩增。扩增反应起始用 94℃变性 4 min，随后 94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 2 min 进行 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min。

（4）在 0.8%（*m/V*）的琼脂糖凝胶分离并分析 PCR 产物，凝胶用 EB 染色后在紫外灯下观察。转基因条带大小分别是：*bar* 为 0.59 kb，*hva*1 为 0.70 kb［图 10.3（a）］。

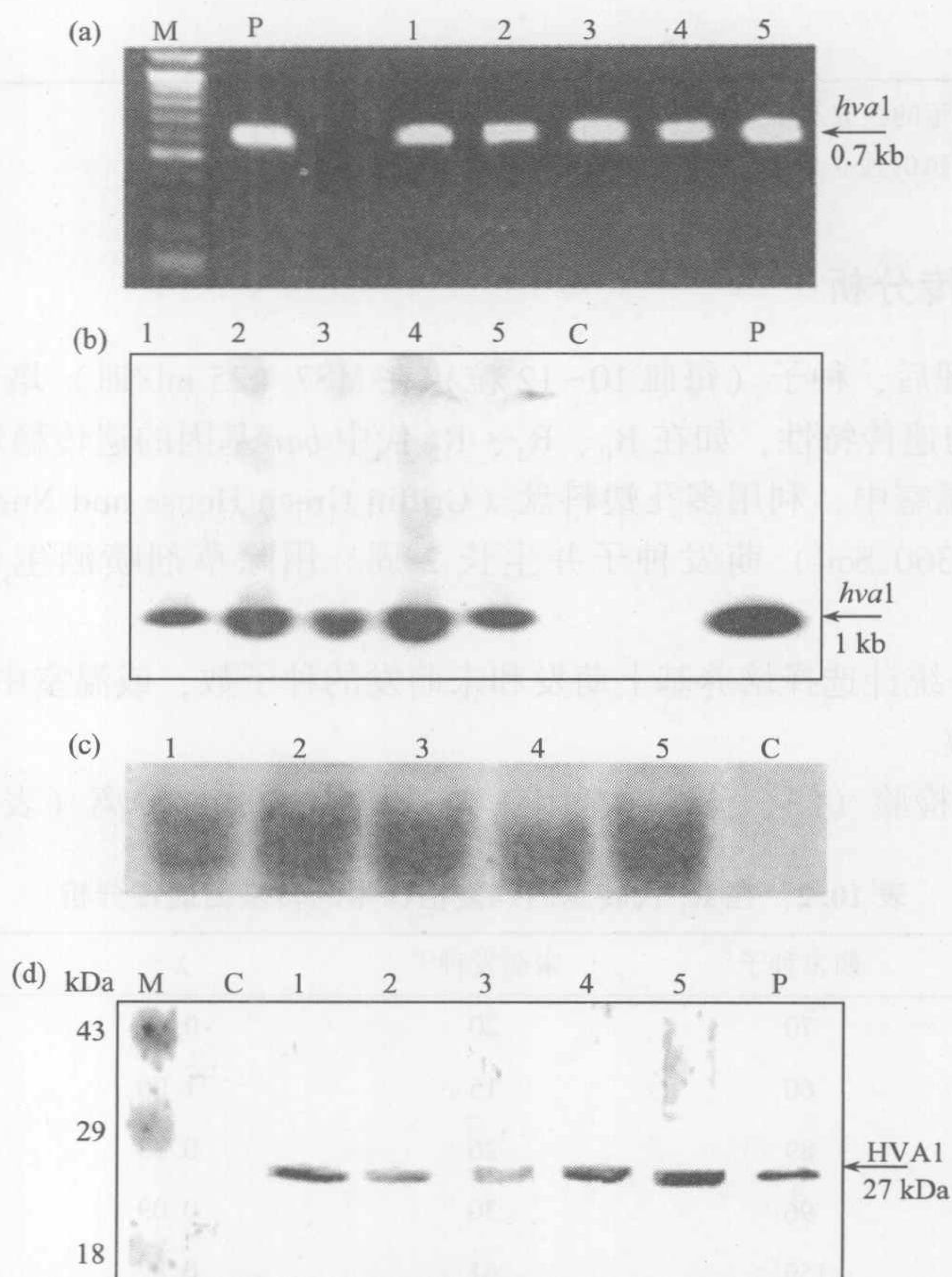


图 10.3　燕麦转基因植株中 *hva*1 的分子分析。（a）PCR 扩增；（b）Southern 杂交分析；（c）Northern 杂交分析；（d）Western 杂交分析。泳道 1~5：R_2 转基因燕麦 Ogle BRA-82、Ogle BRA-17、Ogle BRA-8、Ogle BRA-19 和 Ogle BRA-41；C，非转基因燕麦；P，阳性对照，质粒 DNA（pBY520）或纯化的 HVA1 蛋白

3.5.2　Southern 杂交分析

(1) 用基因编码区（如 *hva*1 或 *bar*1）序列作为探针进行 Southern 杂交［54］。

(2) 用 Phytopure 植物 DNA 提取试剂盒（Amersham-Pharmacia Biotech）提取转基因和非转基因植株的基因组 DNA。

(3) 用 10 μg R_0、R_1 和 R_2 代植株的基因组 DNA 进行 Southern 杂交分析。

(4) 用 *Hin*dⅢ和 *Hin*dⅢ-*Bam*HⅠ限制酶酶切消化基因组 DNA，然后在 0.8% 的琼脂糖胶上电泳分离片段。

(5) 将胶变性和中和并印迹到 Hybond-N^+ 膜上（Amersham-Pharmacia Biotech），依照 Sambrook 等描述的方法［55］。

(6) 用 *Hin*dⅢ-*Bam*HⅠ酶切 pBY520 质粒，在 0.8% 的低熔点胶上分离带有 *hva*1 编码区的片段。切下 1.0 kb 的片段，用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化该片段。

(7) 用 Rad 引物标记试剂盒（GIBCO BRL）对纯化的基因特异的 DNA 片段进行［^{32}P］-dCTP 放射性标记，方法参照说明书。

(8) 按照标准程序［55］用 *hav*1 基因特异探针与准备好的膜进行杂交。

(9) 随后，−80℃条件下用 X 光胶片（Kodak）放射自显影分析杂交膜［图 10.3(b)］。

3.5.3　Northern 杂交分析

(1) 用 TRIZOL（GIBCO BRL）提取转基因和非转基因植株幼叶的总 RNA，方法参照说明书。

(2) 依照 Sambrook 等的方法在 1.2% 的琼脂糖-甲醛变性胶中电泳分离 10μg 总 RNA［55］。

(3) 依照 Sambrook 等的方法将胶印迹到 Hybond-N^+ 尼龙膜（Amersham-Pharmacia Biotech）上［55］。

(4) 按照标准的 Northern 杂交程序［55］，用^{32}P 标记的基因特异的探针分析 *hva*1 的转录情况［图 10.3（c）］。

3.5.4　Western 杂交分析

(1) 蛋白质提取、Western 杂交和免疫检测参照 Xu 等的方法［48］。

(2) 在液氮中研磨约 0.1 g 转基因和非转基因植株的新鲜叶片，加入 0.2 ml 蛋白提取缓冲液提取蛋白质。

(3) 用 Bio-Rad 蛋白分析试剂（Bio-Rad）按 Bradford 的方法测定每一样品的总蛋白浓度［56］。

(4) 用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 100 μg 转基因和非转基因样品的可溶性总蛋白。

(5) 电泳结束后，使用半干转移系统（Bio-Rad）将蛋白质电转到硝酸-纤维素膜上（Amersham-Pharmacia Biotech），方法参照仪器说明。

(6) 将 Western 膜分别和转基因特异蛋白（如 HVA1）免疫产生的一抗（如兔抗血

清）及二抗（带有碱性磷酸酶的兔 IgG 的抗体，Sigma-Aldrich）孵育。

（7）在碱性磷酸酶的缓冲液中进行膜显色［图 10.3（d）］。

3.6 转基因的生化分析

（1）对转基因和非转基因植株的整株或不同的器官进行转基因的生化分析，如 GUS 分析（图 10.2（e）~（h）；［48］）。

（2）为去除叶绿素，将绿色组织先在 70% 乙醇中浸泡 2 h，然后在 100% 乙醇中过夜处理（此步骤应在在 37℃孵育后进行）。

（3）抽真空以去除组织中的气体。

（4）将样品浸入 GUS 底物中［10 mmol/L EDTA（pH 7.0）、0.1 mol/L $NaPO_4$（pH 7.0）、1~5 mmol/L X-Gluc；X-Gluc 可溶解在二甲基亚砜中；Sigma］，抽真空后立即在 37℃孵育（57）。

（5）为了观察 GUS 表达部位，制作徒手横切片，然后在 Zeiss SV8 体视镜 或 Zeiss Axioskop 常规显微镜下观察。

3.7 *hva*1 转基因植株在胁迫条件下的评价

3.7.1 离体培养条件下的盐胁迫

（1）取转基因和非转基因每个株系 50 或 60 粒种子（R_0、R_1、R_2 的种子；见注 12）进行表面消毒。每皿 MS7 培养基（25 ml/皿）上播 10~12 粒种子，于 25℃暗培养萌发 4 天（见注 13）。非转基因的种子用不加草胺膦或双丙胺膦的 MS7 培养基。

（2）将萌发种子分为两组，一组不加盐胁迫而另一组生长在盐胁迫条件下。

（3）从每一独立的转基因和非转基因株系中移出 4~5 棵正在生长的苗到加有 NaCl 或没有 NaCl 的 MS8 培养基上（50~70 ml/Magenta），在 25℃ 和 60 μm/(m^2·s) 的光照条件下生长。最少 4 个重复。

（4）6 天后，观察转基因和非转基因植株在加盐和不加盐条件下的生长状况［图 10.2（i）］。

（5）进行测定，如植株鲜重（见注 14）、株高、根长、干重（见注 15；表 10.3）。

表 10.3　离体培养条件下用燕麦幼苗分析盐胁迫耐受性

株系	地上部长度			根长		
	非胁迫/cm	盐胁迫/cm	渗透胁迫/cm	非胁迫/cm	盐胁迫/cm	渗透胁迫
非转基因	10.67 ±0.45	6.26 ±1.1	5 ±1.2	4.02 ±0.45	2 ±0.6	2.4 ±0.6
Ogle BRA-82	12.23 ±0.52*	9.05 ±0.5*	9 ±0.56*	5.8 ±0.88*	3.3 ±0.48*	3.9 ±0.52*
Ogle BRA-17	11 ±1	7 ±0.64	9 ±0.7*	5.5 ±0.7*	2.5 ±0.4	3.4 ±0.3
Ogle BRA-8	10.8 ±0.7	9.3 ±0.4*	8 ±1	3.64 ±0.6	2.9 ±0.3	3.3 ±0.4
Ogle BRA-19	11 ±0.8	8.5 ±0.9	9.4 ±0.4*	3.9 ±0.4	3.8 ±0.6*	3.8 ±0.5*
Ogle BRA-41	12.3 ±0.9*	8.5 ±0.8	9.1 ±0.63*	4.3 ±0.9	2.7 ±0.4	3.6 ±0.25*

注：* $P<0.05$

（6）对数据进行方差分析［58］。

（7）Tukey's 差距检测法在95%置信度水平上比较均值。

（8）将植株移栽至泥炭：珍珠岩（1∶1，V/V）混合的混合土中，并在温室中进一步生长。

3.7.2　温室（盆播）条件下的盐胁迫

（1）依照3.7.1节中的方法在MS7培养基上萌发种子（R_0、R_1或R_2种子）。

（2）将1周大小经过筛选的转基因苗和非转基因对照苗移到小盆（8 cm×4 cm×6 cm）中的混合土中，该混合土中泥炭：珍珠岩为1∶1（每盆一株苗）。

（3）将这些盆放在加水的平底盘中，并在温室中生长1周。

（4）将生长中的苗分成5组，每组中转基因和非转基因株系分别取8~10棵苗。在盐胁迫处理前测定每一株的株高和叶数。

（5）用不同浓度的盐溶液（0 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L和200 mmol/L NaCl）浇灌植物，每天一次持续14天（见注16）。

（6）随后用水浇灌1周让植株恢复。

（7）之后，重新不间断进行5周盐胁迫处理。

（8）实验至少进行4~5次重复。

（9）测定单株株高、根长、分蘖数、单株结实率。比较转基因和非转基因植株在胁迫和非胁迫条件下的生长差异［见注17；图10.2(j)和图10.2(k)］。

（10）对数据进行方差分析统计［58］。

（11）Tukey's 差距检测法在95%置信度水平上比较均值（表10.4）。

表10.4　温室（盆播）条件下分析燕麦的盐胁迫耐受性

株系	每株的结实/g				
	0 mmol/L NaCl	50 mmol/L NaCl	100 mmol/L NaCl	150 mmol/L NaCl	200 mmol/L NaCl
非转基因	16.93	7.26	3.75	2.01	1.11
Ogle BRA-82	12.10	10.29	9.19*	7.64	5.96
Ogle BRA-17	15.44	14.13	13.66*	10.01*	5.90
Ogle BRA-8	16.05	14.45	13.52*	9.82*	5.14
Ogle BRA-19	11.75	11.74	10.59*	8.72*	6.85*
Ogle BRA-41	14.31	13.95	13.73*	9.23*	8.37*

注：* $P<0.05$

3.7.3　离体培养条件下缺水或渗透胁迫

（1）参照3.7.1节的方法，在MS7培养基上萌发种子（R_0、R_1、R_2）（见注18）。

（2）将萌发的种子分成两组：一组生长在不缺水或没有渗透胁迫的条件下，另一组生长在缺水或有渗透胁迫的条件下（见注19）。

（3）将每一独立的转基因和非转基因株系的 4~5 株苗移到 Magenta 盒中加有甘露醇或没有甘露醇的 MS9 培养基上（50~70 ml/Magenta），在25℃光照条件下生长。最少 4~5 个重复。

（4）6 天后，分析转基因和非转基因植株在渗透胁迫和非渗透胁迫条件下的生长状况。

（5）和盐胁迫条件下一样对植株的生长状况进行测定。比较转基因和非转基因植株在胁迫和非胁迫条件下的生长差异（表 10.3）。

（6）将植株移栽到混合土中，其中泥炭与珍珠岩按 1∶1（*V/V*）混合，使其在温室中进一步生长。

3.7.4　温室（盆播）条件下缺水胁迫实验

（1）参照 3.7.1 节的方法，在 MS7 培养基上萌发 30~40 粒种子（R_0、R_1、R_2）（见注 20）。

（2）将 1 周大小的、经过筛选的转基因苗与未经筛选的非转基因苗作对照，移到装有混合土的小盆中（8 cm×4 cm×6 cm），该混合土为泥炭与珍珠岩 1∶1 混合，每盆栽一株苗。

（3）将盆放置于加水的平底盘中，缺水处理前让植株在温室中生长 2 周。

（4）将植株分成加水（a 组）和缺水（b 组）两组，每一组中转基因和非转基因株系各用 8~10 棵苗。在胁迫处理前测定每一株的株高和叶片数。

（5）在 a 组植株的平底盘中加水，持续 1 周。

（6）在 b 组植株的平底盘中只加水 2 天。

（7）加水 2 天后，完全去除 b 组平底盘中的水，以后的 1 周内处于缺水环境。

（8）重复这一过程 5 周。

（9）结束后，测定每一株的株高分蘖数。比较转基因和非转基因植株在胁迫和非胁迫条件下的生长差异。

（10）用方差分析进行数据统计［58］。

（11）Tukey's 差距检测法在 95% 置信度水平上比较均值。

4. 注释

注 1：种子还可用 70% 乙醇消毒 2 min；用无菌蒸馏水洗一次，然后在 50% Clorox 漂白剂中浸泡 15 min，期间以 0.5 *g* 持续振荡。

注 2：用灭菌的滤纸汲取种子上的水分（3 mm；VWR），再将消毒后的种子放置于 MS1 培养基上。

注 3：芽尖包含有顶端分生组织、2~3 个叶原基和叶基。芽尖是靠近叶基的膨大部分。

注4：每一品种放置7~8个皿。为获得不同品种的最佳效果，用不同浓度的2, 4-D（0 mg/L和0.5 mg/L）和N_6-苄基腺嘌呤（0 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、4.0 mg/L和8.0 mg/L）的组合。

注5：计算丛生芽的相对分化频率（见[47]）。

注6：为获得多个质粒转化的最佳结果，用不同质粒摩尔比，如3∶1或2∶1（两个质粒）、1∶1∶1或3∶2∶1（三个质粒），带有选择标记的质粒是比值中的最后一个（即浓度最低）。

注7：用由芽分生组织分化而来的、培养1个月的丛生芽培养物进行基因枪轰击转化［图10.2（a）］；如有必要，在轰击之前去除胚芽鞘和叶片使丛生芽外露。

注8：在26 mmHg气压下，用基因枪微粒加速装置（PDS 1000/He，Bio-Rad）进行轰击，可裂膜到载体膜的距离为1.5 cm，载体膜到终止屏的距离为2 cm，终止屏到样品的距离为6.5 cm，氦气压为1550 psi。

注9：第一次轰击后，将组织放在25℃暗培养直到第二次轰击。

注10：在温室中生长1个月后，将植株移到大盆中（12 cm^2），促进其生长；如有必要，每周施用一次Peters 20∶20∶20的肥料（Griffin Green House and Nursery supplies）。

注11：除草剂的使用：在三叶期最幼嫩的叶片上涂抹除草剂，到六叶期时对整个植株喷洒1% Ignite除草剂，草胺磷活性成分为200 g/L（16.222%）。

注12：用不同的转基因独立株系种子（R_0、R_1或R_2）。在本实验中使用来自5个独立的转基因株系的R_2代Ogle BRA-82、Ogle BRA-17、Ogle BRA-8、Ogle BRA-19和Ogle BRA-41。

注13：将R_0、R_1、R_2代转基因种子种植于MS7选择培养基上，以筛选转基因和非转基因的植株。选用在选择培养基上能够生长的苗，测试对胁迫的抗性。

注14：植物鲜重：从Magenta盒中将整株植株小心取出，不要损伤生长于培养基中的根系，将根系上的培养基清洗掉，再用纸巾汲干，用天平称重（Precision Weighing Balances，Bradford，MA 01835）。

注15：植物干重：将整株植株放入已称重的3 mm滤纸上，滤纸已经烘干至恒重。用铝箔包裹，置于110℃恒温箱中（VWR）烘干24 h。将样品从恒温箱取出放入干燥器中（VWR），避免称重前样品吸水。待其降至室温，称重后减去滤纸的质量，得出每一植株的质量。

注16：在培养基中加入甘露醇，使离体条件下生长的植株产生缺水或渗透胁迫。

注17：这是一个优化的方法，以评估表达*hva*1的转基因株系在温室中环境下对缺水胁迫的耐受性［48］。

注18：5个燕麦Ogle独立转基因株系R_3代BRA-8、BRA-17、BRA-19、BRA-41和BRA-82，由本研究中的R_2代植株繁殖获得［47］，并与对照植株一起置于温室中生长。

注19：每一盐溶液处理一组植株。每天浇灌一次，确保渗透完全，并防止盐过量。

注20：还可进行其他性状的测定，如分蘖数、至抽穗的天数、剑叶叶面积、千粒

重、每穗结实率、花序长度、每个花序的小花数等［48，51］。

致谢

该研究由 MSU 植物育种和遗传工程系、西北植物生物化学联合会、埃及 Assiut Al-Azhar 大学支持。

（徐　磊　易可可　译）

参考文献

1. Hitchcock，A. S.（1971）Manual of the grasses of the United States. Originally published in 1950 as U. S. D. A. Miscellaneous publication No. 200. Dover，New York. Second edition revised by Chase，A.

2. Munz，P. A. and Keck，D. D.（1973）A California Flora（with Supplement by P. Munz）. University of California Press，Berkeley，California.

3. Madson，B. A.（1951）Winter Covercrops. Circular 174，California Agricultural Extension Service，College of Agriculture，University of California，June 1951.

4. Johnny' s selected seeds（1983）Green Manures-A Mini Manual. Johnny' s selected seeds，Albion，Maine 04910.

5. Verhallen，A.，Hayes，A. and Taylor，T.（2003）Cover crops-Oats，Ministry of Agriculture，Food and Rural Affairs，Ontario，Canada.

6. Gibson，L. and Benson，G.（2002）Origin，history，and uses of oat（*Avena sativa*）and wheat（*Triticum aestivum*）. Course Agronomy 212，Iowa State University，Department of Agronomy，Iowa.

7. http：//interactive. usask. ca/Ski/agriculture/crops/cereals/oats. html. Agriculture crops cereals oats. Saskatchewan Interactive，last updated 14 Dec 2002.

8. Forsberg，R. A. and Shands，H. L.（1989）Oat breeding in *Plant Breeding Reviews. Vol.* 6，（Janick，J.，ed.），Timber Press，Portland，OR，pp 167-207.

9. Boyer，J. S.（1982）Plant productivity and environment. *Science* 218，444-448.

10. Roy，M. and Wu，R.（2002）Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science* 163，987-992.

11. Apse，M. P.，Aharon，G. S.，Snedden，W. A. and Blumwald，E.（1999）Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in Arabidopsis. *Science* 285，1256-1258.

12. Schachtman，D. and Lui，W.（1999）Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in Plant Science* 4，281-287.

13. Qadir，M.，Qureshi，R. H. and Ahmad，N.（1998）Horizontal flushing：a promising ameliorative technology for hard salinesodic and sodic soils. *Soil Tillage Research* 45，119-131.

14. Cherry，J. H.，Locy，R. D. and Rychter，A.（1999）Proc. NATO Adv. Res. Workshop，Mragowa，Poland. 13-19 June. Kluwer，Amsterdam，The Netherlands.

15. Martin，R. J.，Jamieson，P. D.，Gillespie，R. N. and Maley，S.（2001）Effect of timing and intensity of drought on the yield of oats（*Avena sativa L.*）. Proceeding of the 10th Australian Agronomy Conference，Hobart.

16. Murty，A. S.，Misra，P. N. and Haider，M. M.（1984）Effect of different salt concentrations on seed germination and seedling development in few oat cultivars. *Indian Journal of Agricultural Research* 18，

129-132.

17. Verma, O. P. S. and Yadava, R. B. R. (1986) Salt tolerance of some oats (*Avena sativa L.*) varieties at germination and seedling stage. *Journal of Agronomy and Crop Science* 156, 123-127.
18. Schonbeck, M. W. (1988) Cover Cropping and Green Manuring on Small Farms in New England and New York: An Informal Survey. Research Report 10, New Alchemy Institute, East Falmouth, MA 02536.
19. Koev, G., Mohan, B. R., Dinesh-Kumar, S. P., Torbert, K. A., Somers, D. A. and Miller, W. A. (1998) Extreme reduction of disease in oats transformed with the 5' half of the barley yellow dwarf virus PAV genome. *Phytopathology* 88, 1013-1019.
20. Stoskopf, N. C. (1985) Barley and Oat, in *Cereal Grain Crops*, (Stoskopf, N. C., ed.), Reston Publishing, Reston, Virginia, pp. 444-458.
21. Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. (2000) Genomic approach to plant stress tolerance. *Current Opinions in Plant Biology* 3, 117-124.
22. Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B. and Cushman, J. C. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131, 1748-1755.
23. Epstein, E., Norlyn, J., Rush, D., Kings-bury, R., Kelley, D., Cunningham, G. and Wrona, A. (1980) Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210, 399-404.
24. Ribaut, J. M. and Hoisington, D. A. (1998) Marker assisted selection: new tools and strategies. *Trends in Plant Science* 3, 236-239.
25. FAO. (1999). Biotechnology in food and agriculture. http://www.fao.org/unfao/bodies/COAG/COAG15/X0074E.htm.
26. Sharma, H. C., Crouch, J. H., Sharma, K. K., Seetharama, N. and Hash, C. T. (2002) Application of biotechnology for crop Transformation of Oats and Its Application 167 improvement: prospects and constraints. *Plant Science* 163, 381-395.
27. Mazur, B., Krebbers, E. and Tingey, S. (1999) Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* 285, 372-375.
28. Rines, H. W., Phillips, R. L. and Somers, D. A. (1992) Application of tissue culture to oat improvement, in *Oat Science and Technology*, (Marshall, H. G., and Sorrels, M. E., eds.), American Society of Agronomy and Crop Science Society, Madison WI, pp. 777-791.
29. Somers, D. A., Torbert, K. A., Pawlowski, W. P. and Rines, H. W. (1994) Genetic engineering of oat, in *Improvement of Cereal Quality by Genetic Engineering*, (Henry, R. J. and Ronalds, J. A., eds.), Plenum, New York, pp. 37-46.
30. Cummings, D. P., Green, C. E. and Stuthman, D. D. (1976) Callus induction and plant regeneration in oats. *Crop Science* 16, 465-470.
31. Rines, H. W. and McCoy, T. J. (1981) Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. *Crop Science* 21, 837-842.
32. Bregitzer, P., Bushnell, W. R., Somers, D. A. and Rines, H. W. (1989) Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. *Crop Science* 29, 798-803.
33. Rines, H. W. and Luke, H. H. (1985) Selection and regeneration of toxin insensitive plants from tissue cultures of oat (*Avena sativa*) susceptible to Helminthosporium victoriae. *Theoretical and Applied Genetics* 71, 16-21.
34. Somers, D. A., Rines, H. W., Gu, W., Kaeppler, H. F. and Bush-Nell, W. R. (1992) Fertile

transgenic oat plants. *Bio/Technology* 10, 1589-1594.

35. Zhang, S., Zhong, H. and Sticklen, M. B. (1996) Production of multiple shoots from apical meristems of oat (*Avena sativa L.*). *Journal of Plant Physiology* 148, 667-671.
36. Torbert, K. A., Rines, H. W. and Somers, D. A. (1998) Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures. *Crop Science* 38, 226-231.
37. Cho, M. J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. (1999) High frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Science* 148, 9-17.
38. Gless, C., Lorz, H. and Jahne-Gartner, A. (1998) Establishment of a highly efficient regeneration system from leaf base segments of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Cell Reports* 17, 441-445.
39. Kaeppler, H. F., Menon, G. K., Skadsen, R. W., Nuutila, A. M. and Carlson, A. R. (2000) Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19, 661-666.
40. Somers, D. A. (1999) Genetic engineering of oat, in Molecular Improvement of Cereal Crops, (Vasil, I. and Phillipes, R., eds.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
41. Choi, H. W., Lemaux, P. G. and Cho, M. J. (2001) High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avena sativa L.*) plants. *Plant Science* 160, 761-762.
42. Zhang, S., Cho, M. J., Koprek, T., Yun, R., Bregitzer, P. and Lemaux, P. G. (1999) Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa L.*) and barley (*Hordeum vulgare L.*) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Reports* 18, 959-966.
43. Zhong, H., Srinivasan, C. and Sticklen, M. B. (1992) *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). II. Differentiation of ear and tassel clusters from cultured shoot apices and immature inflorescences. Planta 187, 483-489.
44. Zhong, H., Wang, W. and Sticklen, M. B. (1998) In vitro morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: efficient plant regeneration from shoot apices. *Journal of Plant Physiology* 153, 719-726.
45. Devi, P., Zhong, H. and Sticklen, M. B. (2000) *In vitro* morphogenesis of pearl millet (Pennisetum glaucum (L.) R. *Br.*): efficient production of multiple shoots and inflorescences from shoot apices. *Plant Cell Reports* 19, 546-550.
46. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W. and Sticklen, M. B. (2001) Shoot apical meristem: *In vitro* plant regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum L.*). *In Vitro Cellular and Developmen. Biology-Plant* 38, 163-167.
47. Maqbool, S. B., Zhong, H., El-Maghraby, Y., Ahmad, A., Chai, B., Wang, W., Sabzikar, R. and Sticklen, M. B. (2002) Competence of oat (*Avena sativa L.*) shoot apical meristems on integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing the *hva*1. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 201-208.
48. Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, *T.* and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA*1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110, 249-257. 168 Maqbool et al.
49. Patnaik, D. and Khurana, P. (2003) Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum L.*) and pasta (T. durum L.) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli. BMC Plant Biology 3, 1-11.
50. Maqbool, S. B., Zhong, H. and Sticklen, M. B. (2004) Genetic engineering of oat (Avena sativa L.)

via the biolistic bombardment of shoot apical meristems, in Transgenic Crops of the World-Essential Protocols, Chap. 5, (Curtis, I. S., ed.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 63-78.

51. Oraby, H. F., Ransom, C. B., Kravchenko, A. N. and Sticklen, M. B. (2005) Barley HVA1 gene confers salt tolerance in R3 transgenic oat. *Crop Science* 45, 2218-2227.

52. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15, 473-497.

53. Strickberger, M. W. (1985) Genetics, 3rd ed. Macmillan, New York, pp. 126-146.

54. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98, 503-517.

55. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab, New York.

56. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248-254.

57. Jafferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6, 3901-3907.

58. Lamb, C. R. C., Milach, S. C. K., Pasquali, G. and Barro, R. S. (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration derived from mature embryos of oat. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 37, 123-130.

via the biolistic bombardment of shoot apical meristems. *In* Transgenic Crops of the World-Essential Protocols. Chap. 5. (Curtis, I. S., ed.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 63-78.
51. Oraby, H. F., Ransom, C. B., Kravchenko, A. N. and Sticklen, M. B. (2005) Barley HVA1 gene confers salt tolerance in R3 transgenic oat. Crop Science 45, 2218-2227.
52. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15, 473-497.
53. Strickberger, M. W. (1985) Genetics, 3rd ed. Macmillian, New York, pp. 125-146.
54. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98, 503-517.
55. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., New York.
56. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248-254.
57. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6, 3901-3907.
58. Lamb, C. R. C., Milach, S. C. K., Pasquali, G. and Barro, R. S. (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration derived from mature embryos of oat. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 37, 123-130.

第三篇　基因与蛋白质的表达

第 11 章　决定转基因表达的启动子序列

Huw D. Jones　Caroline A. Sparks

摘　要：利用转基因手段为主的反向遗传学实验设计时，通常要求外源基因按照预先设定的模式进行表达，而有关特定启动子的基因表达谱信息则很有限。鉴于相同的启动子-转基因构建在不同的物种中可产生不同的表达模式，预先确定待转化外源基因的表达模式就显得尤为重要。本章就禾谷类作物已鉴定的组成型、特异型或诱导型启动子进行了比较。

关键词：启动子，调控元件，转基因表达，组成型，组织特异性，诱导型，报告基因

1. 引言

传统的观点认为真核生物基因的表达是由位于同一分子（顺式元件）上的 DNA 序列与不同 DNA 分子（反式作用信号）编码的蛋白质或 RNA 之间的相互作用来调控的。这些顺式作用元件包括 CAAT 框和 TATA 框、启动子本身的响应元件、编码区远上游或下游端的增强子元件、5′及 3′非编码区（UTR）、内含子、多聚腺苷酸信号等。然而，这个相当简单的观点一直受到怀疑，特别是随着人们对哺乳动物生物学知识了解的逐步深入，该观点也得到更新和完善。（见示例［1，2］）。虽然人们对基因表达调控的信号系统尚不完全清楚，但利用较短的启动子序列（至多 2 kb），以及启动子下游转录单元内增强基因表达的内含子序列，可以清楚地阐明重组基因的表达模式［3~6］。

在设计植物转化试验时，首个难题就是构建一个包含目的基因和合适的调控序列的表达框，以产生预期的基因表达模式。如果所选择的启动子序列以前并未在将要转化的物种上检测过，建议首先使用可量化的报告基因做检测，如 *gfp* 或者 *uid*A（GUS）基因。本章综述了在禾谷类作物中已被证实为组成型、组织特异性或诱导型表达的各种启动子序列。表 11.1 列出了小麦、大麦或燕麦的所有已用于报告基因表达研究的启动子及代表性文献，以便读者可以进一步查询。我们亦可从“性状”（非报告基因）或选择性标记基因的表达，推断启动子功能的相关信息，但表 11.1 中并未列出这些研究。此外，所列出的启动子序列已应用于大面积种植的水稻和玉米的研究中。

表 11.1 稳定转化的小麦、大麦或燕麦中利用报告基因验证启动子的表达情况及范例

启动子	质粒名称(参考文献)/启动子/报告基因/终止子框	物种及转化方式	报道的表达情况	参考文献
组成型启动子				
Adh1	pBargus[7] 玉米 Adh1+Adh1 内含子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(株系来自 GAF-30/Park);基因枪轰击可再生性愈伤组织	GUS 在抗 PPT 的愈伤组织及种子中表达	[8]
		小麦(cv. Parvon and RH770019);基因枪轰击可再生性愈伤组织	GUS 在抗 PPT 的愈伤组织、根尖及种子中表达	[9]
Ubi1	pAHC25[10,11] 玉米 Ubi1+Ubi 内含子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(var. Melys);基因枪轰击可再生性愈伤组织	GUS 在叶片中表达	[12]
		大麦(cv. Golden Promise);基因枪轰击幼嫩盾片	由于甲基化和染色质浓缩导致 *uid*A(Gus)和 *bar* 基因沉默	[13]
		小麦(NILs L88-6 and L8831);基因枪轰击幼嫩盾片	组织化学染色显示,GUS 呈组成型表达,通常在幼嫩、代谢旺盛的组织和花粉粒中活性较强	[14]
	pAHC15[11] 玉米 Ubi1+Ubi 内含子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(株系来自 GAF-30/Park);基因枪轰击可再生性愈伤组织	组织化学染色显示,GUS 在新生的愈伤组织、花药、柱头和叶片有活性	[15]
Act1	pACT1-F[16] 水稻 Actin+第一内含子/外显子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(var. Melys);基因枪轰击可再生性愈伤组织	GUS 在叶片中表达	[12]
	pDB1[17] 水稻 Actin+第一内含子/外显子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(var. Jumbo);基因枪轰击叶基部	组织化学染色显示,花粉、花器官和叶片中有 GUS 活性	[8]
		小麦(var. Florida);基因枪轰击幼嫩盾片	组织化学染色显示,叶片中有 GUS 活性	[17]
	pAct1sGFP-1[19] 水稻 Actin+第一内含子/外显子::*sgfp*(S65T)::nos 3′	燕麦(var. Garry);基因枪轰击可再生性愈伤组织	GFP 在幼芽分生组织(SMC)、花药、子房、柱头及种子中表达	[20]
		小麦(cv. Fielder);基因枪轰击幼嫩盾片	GFP 在再生愈伤组织、叶片、发育的芽及胚胎中表达	[21]

续表

启动子	质粒名称(参考文献)/报告基因/终止子框 启动子	物种及转化方式	报道的表达情况	参考文献
		大麦(cv. Golden Promise);基因枪轰击幼嫩盾片	GFP 在愈伤组织、花粉、子房、柱头、根、幼胚及胚乳中表达	[22]
	pRC-62[16, 23] 水稻 Actin1D + 第一内含子/外显子::: *uid*A (Gus)/nptII::nos 3′	小麦 (cv. Fielder);基因枪轰击幼嫩盾片	组织化学染色显示,叶片、子房、柱头、花药和花粉中有 GUS 活性	[24]
CaMV 35S	pJIT102 CaMV 35S :: *uid*A(Gus)::CaMV35S 3′	燕麦(var. Melys);基因枪轰击可再生性愈伤组织	未检测到 CaMV 35S 启动子的表达	[12]
H2B	pHP12679 玉米组蛋白 H2B+Ubi1 内含子 1:: *uid*A (Gus)::pinII 3′	小麦(var. Cadenza);基因枪轰击幼嫩盾片	组成型表达。GUS 在受检测的所有组织中均表达	[25]
组织特异型启动子				
HMWG	pHMW-GUS 小麦高分子质量麦谷蛋白亚基 Glu-1D-1:: *uid*A (Gus)::nos 3′(-1191 到+58)	硬粒小麦(var. Ofanto);基因枪轰击幼嫩花序	在开花后 10~12 天(DPA)的胚乳中特异性表达	[26]
LMWG	pLMWG1D1-326 pLMWG1D1-938 小麦低分子质量麦谷蛋白亚基 LMWG1D1 ::nos 3′(两个片段分别是-326 到+30 和-938 到+30)	小麦(cv. Bobwhite);基因枪轰击幼嫩盾片	在开花后约 14 天的胚乳中特异性表达,启动子序列越长,表达越强	[27]
B-和 D-hordein	pHorB-Gus 和 pHorD-Gus 大麦 B-和 D-醇溶蛋白(分别为 1043 bp 和 834 bp:: *uid*A (Gus)::nos 3′	小麦(cv. Bobwhite);基因枪轰击幼嫩盾片	组织化学染色显示,GUS 在胚乳中有活性,在叶片、根及花中无活性	[28]
	pD11-Hor3[29]p16 大麦 B1-醇溶蛋白(550 bp):: *uid*A (Gus)::nos 3′和大麦 D-醇溶蛋白(434 bp)::*uid*A(Gus)::nos 3′		在早期至成熟中期的胚乳中高度表达	[30]

续表

启动子	质粒名称(参考文献)/报告基因/终止子框　启动子	物种及转化方式	报道的表达情况	参考文献
	pDhsGFP-1 大麦 D-醇溶蛋白::*sgfp*(S65T)::nos 3′	大麦(cv. Golden Promise);基因枪轰击幼嫩盾片	GFP 仅在胚乳中特异性表达	[22]
Pin A 和 Pin B	Pina::*uid*A Pinb:: *uid*A[32] 小麦 puroindoline a 和 b:: *uid*A (Gus)::nos 3′	小麦(var. Cadenza 和 硬粒小麦 var. Ofanto);基因枪轰击幼嫩花序和盾片	GUS 仅在淀粉胚乳中表达	[31]
αamy1 和 αamy2	pα1GT pα2GT[34] 小麦 α-淀粉酶 1 或 2:: *uid*A (Gus):: nos 3′	小麦(var. Cadenza);基因枪轰击幼嫩盾片	组织化学分析表明,GUS 在发芽 4 天后的盾片和胚轴中表达	[33]
asi	pA57 大麦双功能 α-淀粉酶抑制蛋白(1033-asi 启动子)::*sgfp*(S65T) :: nos 3′	大麦(cv. Golden Promise);将胚性愈伤组织与农杆菌共培养获得稳定转基因植株	GFP 在发育的不同组织和成熟谷粒中特异性表达,但在根和叶片中不表达。有时启动子的效果会受 GA 的调控	[35]
Em	pEvec202Em. gfpnos 小麦 Em (646-bp Early methionine)::*sgfp*(S65T) :: nos 3′	大麦(cv. Golden Promise);将胚性愈伤组织与农杆菌共培养获得稳定转基因植株	GFP 在胚、糊粉层及胚乳传递细胞和糊粉层间的连接处特异性表达。大麦和水稻的 GUS 时空表达有差异	[36]
AsGlo1	pRSHOG 和部分缺失 燕麦 globulin::GFP::rbcS 3′	大麦(cv. Golden Promise);将胚性愈伤组织与农杆菌共培养获得稳定转基因植株	GFP 在胚乳中特异性表达	[37]
其他表达模式的启动子				
Lem1	pBSD5sGFP 大麦 Lem1:: *sgfp*(S65T) :: nos 3′	小麦(cv. Bobwhite);基因枪轰击幼嫩盾片	GFP 在开花期的花外周器官特异性表达	[38]
Lem2	p1414 和不同缺失(39) 大麦 Lem2:: *sgfp*(S65T) ::nos 3	大麦(cv. Golden Promise);基因枪轰击幼嫩盾片	GFP 表达具有强烈的细胞和组织特异性,外稃/内稃、颖片、胚芽鞘、叶耳、叶舌中均有 GFP 的表达,让人意想不到的是外果皮中也有 GFP 的表达	[40]

续表

启动子	质粒名称(参考文献)/报告基因/终止子框	启动子	物种及转化方式	报道的表达情况	参考文献
AGPL1	pAGP2::GUS[41]	小麦 ADP-glucose pyrophosphorylase 大亚基::*uid*A(Gus)::nos 3′	小麦(cv. Chinese Spring);基因枪轰击胚性愈伤组织	GUS 在胚乳、花粉和心皮中特异性表达	[42]
				GUS 在胚乳和糊粉层特异性表达	[41]
SCBV	pSCBV-3m[43]	甘蔗杆状病毒+玉米 Adh1 前导区及第一内含子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(cv. GAF-30/Park)、大麦(cv. Golden Promise)及小麦(cv. Bobwhite);基因枪轰击胚性愈伤组织或幼胚	GUS 在不同物种的各组织中表达活性有差异	[44]
CoYMV	pCoYMV-GUS[45]	鸭趾草黄斑驳病毒(−1026 至 +12)+Adh1 内含子::*uid*A(Gus)::nos 3′	燕麦(株系来自 GAF-30/Park);基因枪轰击可再生性愈伤组织	GUS 集中在茎、叶和颖片的维管束及根中表达,子房部位染色很深,盾片中有 GUS 表达,但花药和胚乳中未见阳性染色	[46]
End1	pPsEND1gusA[47]	豌豆 END1(2,731 bp)::*uid*A(Gus)::nos 3′	小麦(cv. Bobwhite);基因枪轰击幼嫩盾片	GUS 集中在花粉表达;二核小孢子和花粉管阶段	[48]

2. 组成型基因的表达

若要获得稳定的转基因株系、进行瞬时超表达方法等转化研究工作，往往要求基因在所有组织和发育各阶段均能够高强度表达。为了使转入基因能产生普遍的组成型表达，在双子叶植物中通常使用附加或未附加不同上游激活区（UAR）的花椰菜花叶病毒 35S（CaMV 35S）启动子［49，50］。该启动子也用于禾谷类作物以表达选择性标记基因和性状基因。在水稻中，通过检测报告基因，已掌握了该启动子的一些表达特征［51~53］。然而，关于 CaMV 35S 在小麦、大麦或燕麦转化中的表现，学者们各持己见。一些作者认为，与单子叶植物启动子相比，CaMV 35S 出现标记基因低水平表达和高频率失活现象［12，54，55］。在禾谷类作物中，已得到检测的还有其他一些病毒启动子序列，包括从水稻东格鲁杆状病毒（RTBV）和夜香树黄曲叶病毒（CmYLCV）获得的序列。启动子缺失试验表明，RTBV 启动子在转基因水稻的维管束或韧皮部特异表达［56~61］。在转基因小麦中，RTBV 启动子可驱动 GUS 在花粉和根组织以外的各种组织中强烈表达（作者未发表结果）。在转基因拟南芥、烟草、玉米及水稻中，CmYLCV 启动子可以激活 GUS 或 GFP 组成型表达［62］。

在禾谷类作物的转化试验中，通常优先使用两个单子叶植物启动子（Ubil 和 Act1），而不是病毒序列。Ubi1 由玉米泛素启动子与其第一个外显子和第一个内含子构建而成［10，11］，Act1 由水稻肌动蛋白启动子与其内含子构建而成［63］。在水稻［64，65］、玉米［66］和小麦［3，14］中，用玉米 Ubi1 启动子驱动的 *uid*A（GUS）报告基因，能够在多数组织中强烈表达。在幼嫩、代谢旺盛的组织和花粉中，通常 GUS 的表达水平较强；而在老叶、根部及花药的体细胞组织中，GUS 表达水平很低或者不表达［图 11. 1（a）和图 11. 1（b）］。虽然玉米 Ubi1 启动子具有很高水平的本底表达，但依然受热激和胁迫的诱导［64］，而这种诱导性在大多数玉米 Ubi1 启动子的转基因研究中并未被积极利用。玉米 Ubi1 的热激元件已被鉴定，当采用豌豆凝集素启动子的一个碱性结构域/亮氨酸拉链因子结合位点替换 Ubi1 的热激元件时，则会改变基因在种子内的表达分布，即表达由胚转向胚乳［66］。其他一些泛素启动子在单子叶植物转化中也得到鉴定，包括从水稻中分离出的 RUBQ2 和 Rubi3［67，68］，以及从甘蔗中分离出的 ubi4 和 ubi9［69］启动子，所有这些启动子的表达活性与玉米 Ubi1 或 CaMV 35S 相当甚至更高。玉米 Ubi1 驱动 *GUS* 基因在转基因拟南芥、番茄、烟草和松树的根中也获得了很好的表达［70］。

Actin 基因的启动子是可以替代泛素的另一个理想启动子。水稻 Actin 启动子（Act1-D）由 *Act*1 基因翻译起始密码子上游 2. 1kb 的一段序列组成。该序列包含了 GUS 高水平表达的所有 5′调控因子，其为水稻和玉米瞬时转化［16，63］以及水稻稳定转化［71］所必需。除启动子区的序列外，Act1-D 还包括了 *Act*1 基因 5′内含子和第一外显子的部分序列。据报道，Act1-D :: GUS 在转基因水稻株系的孢子体和配子体组织中均呈组成型表达［71］。定量分析表明，转化体中 GUS 蛋白量占总可溶性蛋白的 3%［71］。在小麦中，Act1-D 启动子能驱动基因在各发育阶段的所有主要组织中强烈表达

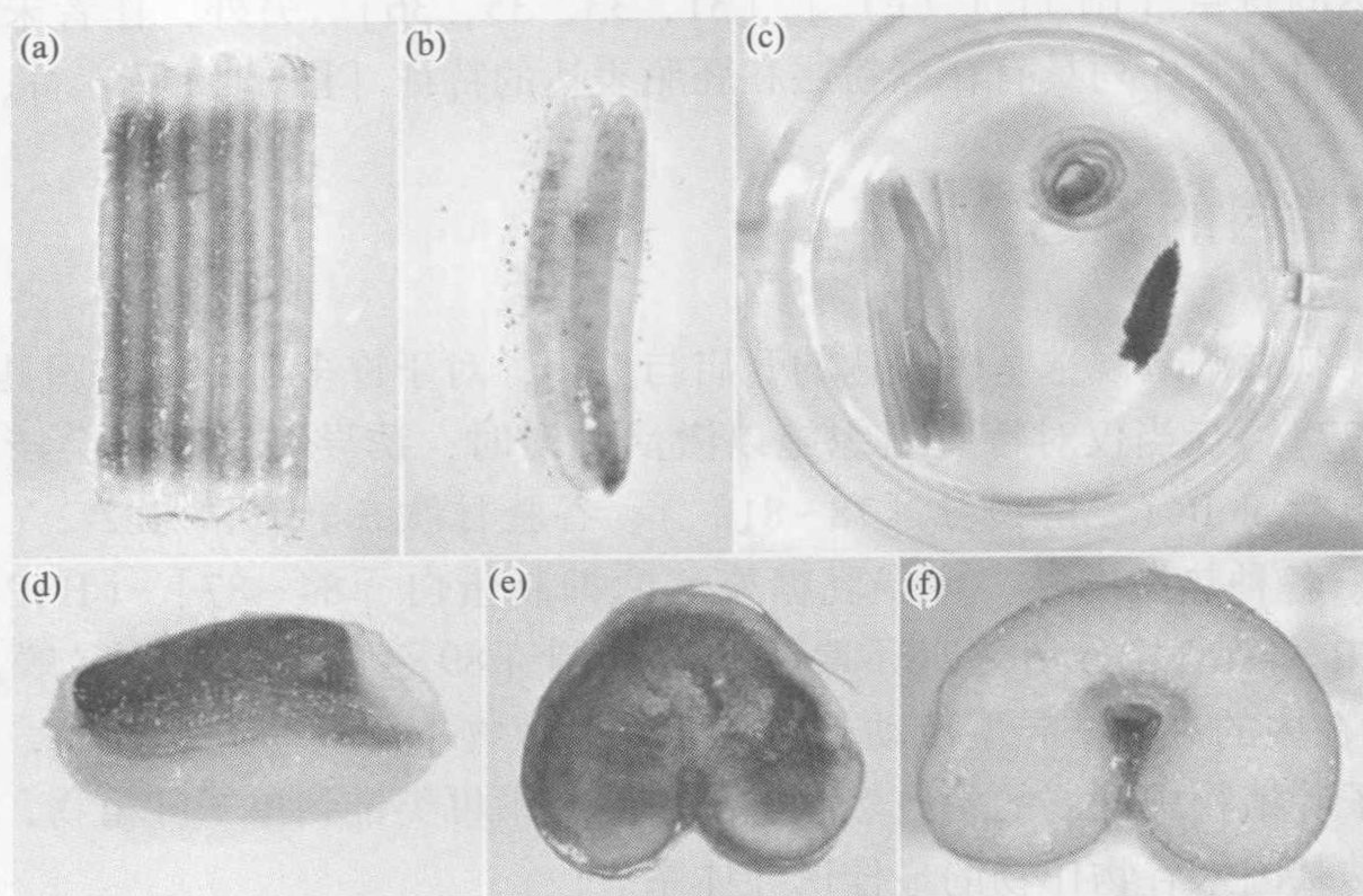


图 11.1　不同启动子驱动 GUS 在稳定转化小麦不同组织中的表达情况。(a) 玉米 Ubiquitin1+内含子驱动 GUS 在 Cadenza 叶片中的表达；(b) 玉米 Ubiquitin1+内含子驱动 GUS，Cadenza 花药的花粉被染上了颜色；(c) 水稻 Actin1 启动子驱动 GUS 在 Cadenza 的茎和幼嫩花序中的表达；(d) 小麦高分子质量谷蛋白 (HMW) Glu-1D-1 启动子驱动 GUS 在 Ofano 半粒成熟种子中的表达表现出胚乳特异性；(e) Ofano 半粒成熟种子示小麦嘌呤吲哚蛋白 b (pinb) 启动子在淀粉胚乳中的表达；(f) Cadenza 半粒种子示玉米 Glb1 启动子在糊粉层传递细胞中的表达（见图版）.

（作者未发表的数据）。在转基因燕麦中，水稻 Act1-D 和截短的 Act1 启动子（Act1F）均被用来驱动 *uidA* 表达［12，18］，但尚未有这些转基因株系详细分析的报道。

在谷类作物中得到鉴定和应用的其他类型的组成型表达的启动子还有：携带 Ubi 第一个内含子的玉米 H2B 启动子［25］、玉米 Adh1 启动子［8，9］、水稻细胞色素 c 启动子（OsCc1）［72］，以及来自地三叶草矮化病毒（SCSV）的一系列调控序列［73］。

3. 组织特异性基因的表达

在自然状态下，依据基因产物的作用，大多数植物基因的表达具有器官或组织特异性。当用 1kb 或 2kb 的启动子构建异源表达框时，基因在新的表达框通常仍能保持其原有的空间特异性。例如，小麦高分子质量谷蛋白亚基基因 *Glu-1D-1* 的 1.2kb 启动子序列，在转基因硬粒小麦中驱动报告基因 *uidA* 在淀粉胚乳中特异性表达［26］［图 11.1 (d)］。该启动子及其他的谷蛋白启动子，已被用于驱动外源基因在小麦胚乳中的表达（综述［74］）。其他已经证实的参与种子储藏物调控的启动子还包括：低分子质量谷蛋白亚基启动子［27］、B-和 D-醇溶蛋白启动子［22，28，30］。通过检测报告基因，Em、asi、αamy1、αamy 2，以及嘌呤吲哚蛋白（puroindoline）a 和 b 等启动子均有在种

子内特异表达的特点［图 11.1（e）］［31，33，35，36］。另外，作者未发表的资料表明，球蛋白启动子序列具有在糊粉层和胚胎表达的特征［图 11.1（f）］。

4. 诱导型基因的表达

通过外界刺激调节候选基因表达的开启与关闭，对于许多研究的应用具有重要价值（综述［75~77］）。当仅对特定组织施以激活刺激时，诱导型启动子会产生所谓的组织特异性，包括 alcR（乙醇诱导［78~81］）、谷胱甘肽 S-转移酶/In2-2（安全剂诱导［82，83］）、各种热激诱导多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白［84~87］（HSP，损伤诱导［88］）、TetR 和 tRA（分别受四环素诱导和抑制［89~93］）、EcR（蜕皮激素诱导［94~97］）在内的多种诱导型启动子已在转基因植物中开展研究。然而，大多数的研究都是在双子叶植物中开展的，虽然其中的一些结果可类推到单子叶植物，但是我们确实需要验证转基因禾谷物作物的最佳诱导体系。

致谢

洛桑实验站获得英国生物技术和生物科学研究委员会（BBSRC）的资助。

（张礼霞　译）

参考文献

1. Chakalova, L., Debrand, E., Mitchell, J. A., Osborne, C. S. and Fraser, P.（2005）Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 669-677.

2. Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D. J., Mendelsohn, M., Kirkland, J. and Axel, R.（2006）Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126, 403-413.

3. Salgueiro, S., Pignocchi, C. and Parry, M. J.（2000）Intron-mediated gusA expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 42, 615-622.

4. Vain, P., Finer, K. R., Engler, D. E., Pratt, R. C. and Finer, J. J.（1996）Intron-mediated enhancement of gene expression in maize（Zea mays L）and bluegrass（Poa pratensis L）. *Plant Cell Rep.* 15, 489-494.

5. Rose, A. B. and Beliakoff, J. A.（2000）Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol.* 122, 535-542.

6. Norris, S. R., Meyer, S. E. and Callis, J.（1993）The intron of Arabidopsis thaliana polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Mol. Biol.* 21, 895-906.

7. Fromm, M. E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J. and Klein, T. M.（1990）Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio-Technology* 8, 833-839.

8. Somers, D. A., Rines, H. W., Gu, W., Kaeppler, H. F. and Bushnell, W. R.（1992）Fertile, transgenic oat plants. *Bio-Technology* 10, 1589-1594.

9. Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E. and Vasil, I. K.（1992）Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio-Technology* 10, 667-674.

10. Christensen, A. H. and Quail, P. H.（1996）Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of

selectable and/or screen-able marker genes in monocotyledonous plants. *Transgen. Res.* 5, 213-218.

11. Christensen, A. H., Sharrock, R. A. and Quail, P. H. (1992). Maize polyubiquitin genes-structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.
12. Perret, S. J., Valentine, J., Leggett, J. M. and Morris, P. (2003) Integration, expression and inheritance of transgenes in hexaploid oat (Avena sativa L.). *J. Plant Physiol.* 160, 931-943.
13. Meng, L., Bregitzer, P., Zhang, S. B. and Lemaux, P. G. (2003) Methylation of the exon/intron region in the Ubi1 promoter complex correlates with transgene silencing in barley. *Plant Mol. Biol.* 53, 327-340.
14. Rooke, L., Byrne, D. and Salgueiro, S. (2000) Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. *Ann. Appl. Biol.* 136, 167-172.
15. Cho, M. J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. (1999) High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Sci.* 148, 9-17.
16. McElroy, D., Zhang, W. G., Cao, J. and Wu, R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2, 163-171.
17. Becker, D., Brettschneider, R. and Lorz, H. (1994) Fertile transgenic wheat from micro-projectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5, 299-307.
18. Gless, C., Lorz, H. and Jahne-Gartner, A. (1998) Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments. *J. Plant Physiol.* 152, 151-157.
19. Cho, M. J., Ha, C. D. and Lemaux, P. G. (2000) Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep.* 19, 1084-1089.
20. Cho, M. J., Choi, H. W., Okamoto, D., Zhang, S. and Lemaux, P. G. (2003) Expression of green fluorescent protein and its inheritance in transgenic oat plants generated from shoot meristematic cultures. *Plant Cell Rep.* 21, 467-474.
21. Jordan, M. C. (2000) Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Rep.* 19, 1069-1075.
22. Cho, M. J., Choi, H. W., Jiang, W., Ha, C. D. and Lemaux, P. G. (2002) Endospermspecific expression of green fluorescent protein driven by the hordein promoter is stably inherited in transgenic barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Physiol. Plant.* 115, 144-154.
23. Datla, R. S. S., Hammerlindl, J. K., Pelcher, L. E., Crosby, W. L. and Selvaraj, G. (1991) A bifunctional fusion between beta-glucoronidase and neomycin phosphotransferase-a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 101, 239-246.
24. Nehra, N. S., Chibbar, R. N., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C., Steinhauer, L., Baga, M. and Kartha, K. K. (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant J.* 5, 285-297.
25. Rasco-Gaunt, S., Liu, D., Li, C. P., Doherty, A., Hagemann, K., Riley, A., Thompson, T., Brunkan, C., Mitchell, M., Lowe, K., Krebbers, E., Lazzeri, P., Jayne, S. and Rice, D. (2003) Characterisation of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. *Plant Cell Rep.* 21, 569-576.
26. Lamacchia, C., Shewry, P. R., Di Fonzo, N., Forsyth, J. L., Harris, N., Lazzeri, P. A., Napier, J. A., Halford, N. G. and Barcelo, P. (2001) Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *J. Exp. Bot.* 52, 243-250.

27. Stoger, E., Williams, S., Keen, D. and Christou, P. (1999) Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. *Transgen. Res.* 8, 73-82.

28. Pistón, F., León, E., Lazzeri, P. and Barro, F. (2007) Isolation of two storage protein promoters from Hordeum chilense and characterization of their expression patterns in transgenic wheat. *Euphytica* 162, 371-379, online 10.1007/s10681-007-9530-3.

29. Sorensen, M. B., Muller, M., Skerritt, J. and Simpson, D. (1996) Hordein promoter methylation and transcriptional activity in wild type and mutant barley endosperm. *Mol. Gen. Genet.* 250, 750-760.

30. Cho, M. J., Choi, H. W., Buchanan, B. B. and Lemaux, P. G. (1999) Inheritance of tissue-specific expression of barley hordein promoter-uidA fusions in transgenic barley plants. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1253-1262.

31. Wiley, P. R., Tosi, P., Evrard, A., Lovegrove, A., Jones, H. D. and Shewry, P. R. (2007) Promoter analysis and immunolocalisation show that puroindoline genes are exclusively expressed in starchy endosperm cells of wheat grain. *Plant Mol. Biol.* 64, 125-136.

32. Digeon, J. F., Guiderdoni, E., Alary, R., Michaux-Ferriere, N., Joudrier, P. and Gautier, M. F. (1999) Cloning of a wheat puroindoline gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. *Plant Mol. Biol.* 39, 1101-1112.

33. Stone, M. C. (2003) Understanding the role of gibberellin in the developmental physiology of wheat using a transgenic approach. PhD thesis; Plant Sciences Department, Bristol University, Bristol, pp. 231.

34. Huttly, A. K. and Baulcombe, D. C. (1989) A wheat alpha-AMY2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J.* 8, 1907-1913.

35. Furtado, A., Henry, R., Scott, K. and Meech, S. (2003) The promoter of the asi gene directs expression in the maternal tissues of the seed in transgenic barley. *Plant Mol. Biol.* 52, 787-799.

36. Furtado, A. and Henry, R. J. (2005) The wheat Em promoter drives reporter gene expression in embryo and aleurone tissue of transgenic barley and rice. *Plant Biotech. J.* 3, 421-434.

37. Vickers, C. E., Xue, G. P. and Gresshoff, P. M. (2006) A novel cis-acting element, ESP, contributes to high-level endosperm-specific expression in an oat globulin promoter. *Plant Mol. Biol.* 62, 195-214.

38. Somleva, M. N. and Blechl, A. E. (2005) The barley Lem1 gene promoter drives expression specifically in outer floret organs at anthesis in transgenic wheat. *Cereal Res. Comm.* 33, 665-671.

39. Abebe, T., Skadsen, R. W. and Kaeppler, H. F. (2005) A proximal upstream sequence controls tissue-specific expression of Lem2, a salicylate-inducible barley lectin-like gene. *Planta* 221, 170-183.

40. Abebe, T., Skadsen, R., Patel, M. and Kaeppler, H. (2006) The Lem2 gene promoter of barley directs cell- and development-specific expression of gfp in transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.* 4, 35-44.

41. Thorneycroft, D., Hosein, F., Thangavelu, M., Clark, J., Vizir, I., Burrell, M. M. and Ainsworth, C. (2003) Characterization of a gene from chromosome 1B encoding the large subunit of ADP glucose pyrophosphorylase from wheat: evolutionary divergence and differential expression of Agp2 genes between leaves and developing endosperm. *Plant Biotechnol. J.* 1, 259-270.

42. Chrimes, D., Rogers, H. J., Francis, D., Jones, H. D. and Ainsworth, C. (2005) Expression of fission yeast cdc25 driven by the wheat ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit promoter reduces pollen viability and prevents transmission of the trans-gene in wheat. *New Phytol.* 166, 185-192.

43. Tzafrir, I., Torbert, K. A., Lockhart, B. E. L., Somers, D. A. and Olszewski, N. E. (1998) The sugarcane bacilliform badnavirus promoter is active in both monocots and dicots. *Plant Mol. Biol.* 38, 347-356.

44. Al-Saady, N. A., Torbert, K. A., Smith, L., Makarevitch, I., Baldridge, G., Zeyen, R. J.,

Muehlbauer, G. J., Olszewski, N. E., and Somers, D. A. (2004) Tissue specificity of the sugarcane bacilliform virus promoter in oat, barley and wheat. *Mol. Breed.* 14, 331-338.

45. Medberry, S. L. and Olszewski, N. E. (1993) Identification of cis elements involved in commelina yellow mottle virus promoter activity. *Plant J.* 3, 619-626.
46. Torbert, K. A., Gopalraj, M., Medberry, S. L., Olszewski, N. E. and Somers, D. A. (1998) Expression of the Commelina yellow mottle virus promoter in transgenic oat. *Plant Cell Rep.* 17, 284-287.
47. Gomez, M., Beltran, J. P. and Canas, L. (2004) The pea END1 promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta* 219, 967-981.
48. Pistón, F., García, C., de la Vi? a, G., Beltran, J., Ca? as, L. and Barro, F. (2007) The pea PsEND1 promoter drives the expression of GUS in transgenic wheat at the binucleate microspore stage and during pollen tube development. *Mol. Breed.* 21, 401-405, online doi 10. 1007/s11032-007-9133-7.
49. Odell, J. T., Nagy, F. and Chua, N. H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus35s promoter. *Nature* 313, 810-812.
50. Bevan, M. W., Mason, S. E. and Goelet, P. (1985) Expression of tobacco mosaic-virus coat protein by a cauliflower mosaic-virus promoter in plants transformed by Agrobacterium. *EMBO J.* 4, 1921-1926.
51. Battraw, M. J. and Hall, T. C. (1990) Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-betaglucuronidase gene-expression in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* 15, 527-538.
52. Li, Z. Y., Upadhyaya, N. M., Meena, S., Gibbs, A. J. and Waterhouse, P. M. (1997) Comparison of promoters and selectable marker genes for use in Indica rice transformation. *Mol. Breed.* 3, 1-14.
53. Terada, R. and Shimamoto, K. (1990) Expression of CaMV 35S-Gus gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220, 389-392.
54. Chen, W. P., Chen, P. D., Liu, D. J., Kynast, R., Friebe, B., Velazhahan, R., Muthukrishnan, S. and Gill, B. S. (1999) Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theor. Appl. Genet.* 99, 755-760.
55. Chen, W. P., Gu, X., Liang, G. H., Muthukrishnan, S., Chen, P. D., Liu, D. J. and Gill, B. S. (1998) Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1296-1306.
56. Kloti, A., Henrich, C., Bieri, S., He, X. Y., Chen, G., Burkhardt, P. K., Wunn, J., Lucca, P., Hohn, T., Potrykus, I. and Futterer, J. (1999) Upstream and downstream sequence elements determine the specificity of the rice tungro bacilliform virus promoter and influence RNA production after transcription initiation. *Plant Mol. Biol.* 40, 249-266.
57. Petruccelli, S., Dai, S., Carcamo, R., Yin, Y. H., Chen, S. Y. and Beachy, R. N. (2001) Transcription factor RF2a alters expression of the rice tungro bacilliform virus promoter in transgenic tobacco plants. *P. N. A. S. USA* 98, 7635-7640.
58. Bhattacharyya-Pakrasi, M., Peng, J. Y., Elmer, J. S., Laco, G., Shen, P., Kaniewska, M. B., Kononowicz, H., Wen, F. J., Hodges, T. K. and Beachy, R. N. (1993) Specificity of a promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression in phloem tissues. *Plant J.* 4, 71-79.
59. Mathur, S. and Dasgupta, I. (2007) Downstream promoter sequence of an Indian isolate of rice tungro bacilliform virus alters tissue-specific expression in host rice and acts differentially in heterologous system. *Plant Mol. Biol.* 65, 259-275.
60. Yin, Y. H., Chen, L. L. and Beachy, R. (1997) Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *Plant J.* 12, 1179-1188.

61. Yin, Y. H. and Beachy, R. N. (1995) The regulatory regions of the rice tungro bacilli-form virus promoter and interacting nuclear factors in rice (Oryza sativa L). *Plant J.* 7, 969-980.

62. Stavolone, L., Kononova, M., Pauli, S., Ragozzino, A., de Haan, P., Milligan, S., Lawton, K. and Hohn, T. (2003) Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops. *Plant Mol. Biol.* 53, 703-713.

63. McElroy, D., Blowers, A. D., Jenes, B. and Wu, R. (1991) Construction of expression vectors based on the rice Actin-1 (Act1) 5′ region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* 231, 150-160.

64. Takimoto, I., Christensen, A. H., Quail, P. H., Uchimiya, H. and Toki, S. (1994) Non-systemic expression of a stress-responsive maize polyubiquitin gene (Ubi-1) in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1007-1012.

65. Cornejo, M. J., Luth, D., Blankenship, K. M., Anderson, O. D. and Blechl, A. E. (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol. Biol.* 23, 567-581.

66. Streatfield, S. J., Magallanes-Lundback, M. E., Beifuss, K. K., Brooks, C. A., Harkey, R. L., Love, R. T., Bray, J., Howard, J. A., Jilka, J. M. and Hood, E. E. (2004) Analysis of the maize polyubiquitin-1 promoter heat shock elements and generation of promoter variants with modified expression characteristics. *Transgen. Res.* 13, 299-312.

67. Liu, D. W., Oard, S. V. and Oard, J. H. (2003) High transgene expression levels in sugarcane (Saccharum officinarum L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Sci.* 165, 743-750.

68. Sivamani, E. and Qu, R. (2004) Polyubiquitin RUBI3 promoter and 5 regulatory sequences. Patent WO2004US15286 20040514.

69. Wei, H. R., Wang, M. L., Moore, P. H. and Albert, H. H. (2003) Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. *J. Plant Physiol.* 160, 1241-1251.

70. Lindroth, A. M., Gronroos, R., Clapham, D., Svensson, J. and von Arnold, S. (1999) Ubiquitous and tissue-specific gus expression in transgenic roots conferred by six different promoters in one coniferous and three angiosperm species. *Plant Cell Rep.* 18, 820-828.

71. Zhang, W. G., McElroy, D. and Wu, R. (1991) Analysis of rice Act1 5′ region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3, 1155-1165.

72. Jang, I. C., Choi, W. B., Lee, K. H., Song, S. I., Nahm, B. H. and Kim, J. K. (2002) High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome c gene OsCc1 and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of mono-cots. *Plant Physiol.* 129, 1473-1481.

73. Schunmann, P. H. D., Surin, B. and Water-house, P. M. (2003) A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology II. *The pPLEX series for use in monocots. Funct. Plant Biol.* 30, 453-460.

74. Shewry, P. R. and Jones, H. D. (2007) Genetic improvement of wheat quality, in Wheat: Chemistry and Technology (AACC Monograph Series), (Pomeranz, Y., ed.), American Association of Cereal Chemists, USA, pp. 562.

75. Padidam, M. (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opin. Plant Biol.* 6, 169-177.

76. Ward, E. R., Ryals, J. A. and Miflin, B. J. (1993) Chemical regulation of transgene expression in plants. *Plant Mol. Biol.* 22, 361-366.

77. Gatz, C. and Lenk, I. (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci.* 3, 352-358.

78. Felenbok, B. (1991) The ethanol utilization regulon of Aspergillus nidulans-the ALCAALCR system as a

tool for the expression of recombinant proteins. *J. Biotechnol.* 17, 11-17.

79. Roslan, H. A., Salter, M. G., Wood, C. D., White, M. R. H., Croft, K. P., Robson, F., Coupland, G., Doonan, J., Laufs, P., Tomsett, A. B. and Caddick, M. X. (2001) Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 28, 225-235.
80. Caddick, M. X., Greenland, A. J., Jepson, I., Krause, K. P., Qu, N., Riddell, K. V., Salter, M. G., Schuch, W., Sonnewald, U. and Tomsett, A. B. (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat. Biotech.* 16, 177-180.
81. Salter, M. G., Paine, J. A., Riddell, K. V., Jepson, I., Greenland, A. J., Caddick, M. X. and Tomsett, A. B. (1998) Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant J.* 16, 127-132.
82. Milligan, A. S., Daly, A., Parry, M. A. J., Lazzeri, P. A. and Jepson, I. (2001) The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and in vitro. *Mol. Breed.* 7, 301-315.
83. DeVeylder, L., Van Montagu, M. and Inze, D. (1997) Herbicide safener-inducible gene expression in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 38, 568-577.
84. Liu, H. K., Yang, C. and Wei, Z. M. (2005) Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants. *Plant Sci.* 168, 997-1003.
85. Gulli, M., Rampino, P., Lupotto, E., Marmiroli, N. and Perrotta, C. (2005) The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small hsp gene in barley and maize. *J. Cereal Sci.* 42, 25-31.
86. Raho, G., Lupotto, E., Dellatorre, A., Hartings, H., Perrotta, C. and Marmiroli, N. (1995) Functional analysis of the temperature-dependent expression of the barley Hvhsp17 gene promoter in monocot and dicot cell systems. *Plant Sci.* 106, 63-69.
87. Raho, G., Lupotto, E., Hartings, H., Della-Torre, A. P., Perrotta, C. and Marmiroli, N. (1996) Tissue-specific expression and environmental regulation of the barley Hvhsp17 gene promoter in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 47, 1587-1594.
88. Devoto, A., Leckie, F., Lupotto, E., Cervone, F. and De Lorenzo, G. (1998) The promoter of a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein of *Phaseolus vulgaris L.* is activated by wounding but not by elicitors or pathogen infection. *Planta* 205, 165-174.
89. Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H. and Gatz, C. (1994) A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J.* 5, 559-569.
90. Love, J., Scott, A. C. and Thompson, W. F. (2000) Stringent control of transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using the Top10 promoter system. *Plant J.* 21, 579-588.
91. Bohner, S. and Gatz, C. (2001) Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracyclinerepressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. *Mol. Gen. Genet.* 264, 860-870.
92. Roder, F. T., Schmulling, T. and Gatz, C. (1994) Efficiency of the tetracycline-dependent gene expression system - complete suppression and efficient induction of the ROLB phenotype in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 243, 32-38.
93. Gatz, C., Frohberg, C. and Wendenburg, R. (1992) Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CAMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J.* 2, 397-404.
94. Frova, C. (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plant.* 119, 469-479.

95. Martinez, A., Sparks, C., Drayton, P., Thompson, J., Greenland, A. and Jepson, I. (1999) Creation of ecdysone receptor chimeras in plants for controlled regulation of gene expression. *Mol. Gen. Genet.* 261, 546-552.

96. Martinez, A., Sparks, C., Hart, C. A., Thompson, J. and Jepson, I. (1999) Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 19, 97-106.

97. Padidam, M., Gore, M., Lu, D. L. and Smirnova, O. (2003) Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. *Transgen. Res.* 12, 101-109.

第 12 章 RNA 介导的基因沉默

Silvia Travella　Beat Keller

摘　要：通过转录后水平基因沉默（PTGS）使内源基因下调表达是鉴定植物基因功能的一把钥匙。在植物、真菌和动物界不同的物种中已经发现许多基于 RNA 水平的沉默机制，如转录后水平基因沉默、共抑制、基因压制和 RNA 干扰（RNAi）。其中，RNAi 是最令人感兴趣的发现之一。它是一种由双链 RNA（dsRNA）引发的、具有序列特异性的基因沉默机制，将与目的基因序列同源的双链 RNA 导入体内，可引起该基因编码的 mRNA 降解。用改造的病毒侵染植物也能诱导 RNA 沉默，称之为病毒诱导的基因沉默（VIGS）。与插入突变相比，这些新兴的反向遗传学方法为在大麦和小麦等谷物物种中挖掘功能基因和操控基因的表达提供了更有力的实验工具。本章介绍如何在大麦和小麦中运用 RNAi 和 VIGS 技术研究基因的功能，包括该过程涉及的分子机制及常用的材料和方法，如载体、接种过程和沉默表型分析。

关键词：基因沉默，双链 RNA，RNA 干扰，病毒诱导的基因沉默，发夹 RNA

1. 引言

转录后水平基因沉默（PTGS），又被称为 RNA 沉默，是指在植物中导入双链 RNA（dsRNA）、外源基因或病毒而引起与之同源的植物基因下调表达。在 PTGS 过程中，目的基因能转录，但转录产物由于迅速被降解而不能积累［1，2］。RNA 干扰（RNAi）过程中 dsRNA 直接诱导与其同源的特异 mRNA 降解［3~5］。RNAi 的发现和对它的分子解析是现代科学史上最重要的技术突破之一。十几年前，在植物和真菌中，人们无意中发现 RNA 均能抑制蛋白质的表达，后来这种现象被分别定义为共抑制和基因压制［6，7］。共抑制是指外源基因与同源的内源基因表达同步降低。最初这些发现说明基本的机制发生于转录后水平，并具有序列特异性。1998 年，Fire 和 Mello 以及他们的同事首次在秀丽新小杆线虫（*Caenorbabditis elegans*）中发现，双链 RNA 是序列特异的 RNA 降解的原因［3］，这一发现实现了真正的理论突破。2006 年，由于这个里程碑式的发现，Fire 和 Mello 被授予诺贝尔生理学或医学奖。后来的研究证明，dsRNA 也是植物 PTGS 和真菌基因压制的有效起始因子［8，9］。不同实验室的类似实验都证实，dsRNA 是导致线虫、植物和真菌中的 RNA 沉默的触发因子，说明这是一种存在普遍的机制。几年后，研究证实 dsRNA 介导的基因沉默所需的基因也是相类似的（综述，见［10］）。

含有目的基因的病毒载体可以通过病毒诱导的基因沉默（VIGS）系统［11］引发

植物的 PTGS，能够产生发夹转录物（hairpin RNA，hpRNA）［12］的反向重复序列、反义 RNA 技术［13］、基因过量表达（共抑制），都能在植物中引发 PTGS。进一步研究表明，在植物和无脊椎动物中，引发 RNAi 的作用元件是小分子的双链 RNA（small interfering RNA，siRNA）［4，14，15］，而它是在细胞质中由 Dicer 酶［15］降解 dsRNA 产生的。siRNA 长度为 21～22 nt，其 3′端含有 2 个游离未配对的核苷酸。Dicer 识别 dsRNA 并从两端将其切断，形成 siRNA。在植物和动物中，siRNA 介导的 RNA 沉默的途径有所不同。例如，在植物中，两种不同的短 siRNA（21～22 nt）和长 siRNA（24～26 nt）均可积累［16］，而在动物中只有短 siRNA 积累［4］。siRNA 通过序列互补性与 RNA 诱导的基因沉默复合物［RISC］结合，并切割内源 RNA 转录产物而引起基因沉默。siRNA 也负责放大沉默信号，它编码的内源 RNA 能通过植物基因组编码的 RNA 介导的 RNA 多聚酶（RdRP）［17，18］转化成 dsRNA。因此，几个 dsRNA 分子足以长期引发目的基因的沉默，并通过细胞分裂传播到植物未处理的细胞和组织中，且能稳定遗传。图 12.1 以图表的形式对 RNAi 机制进行了总结。

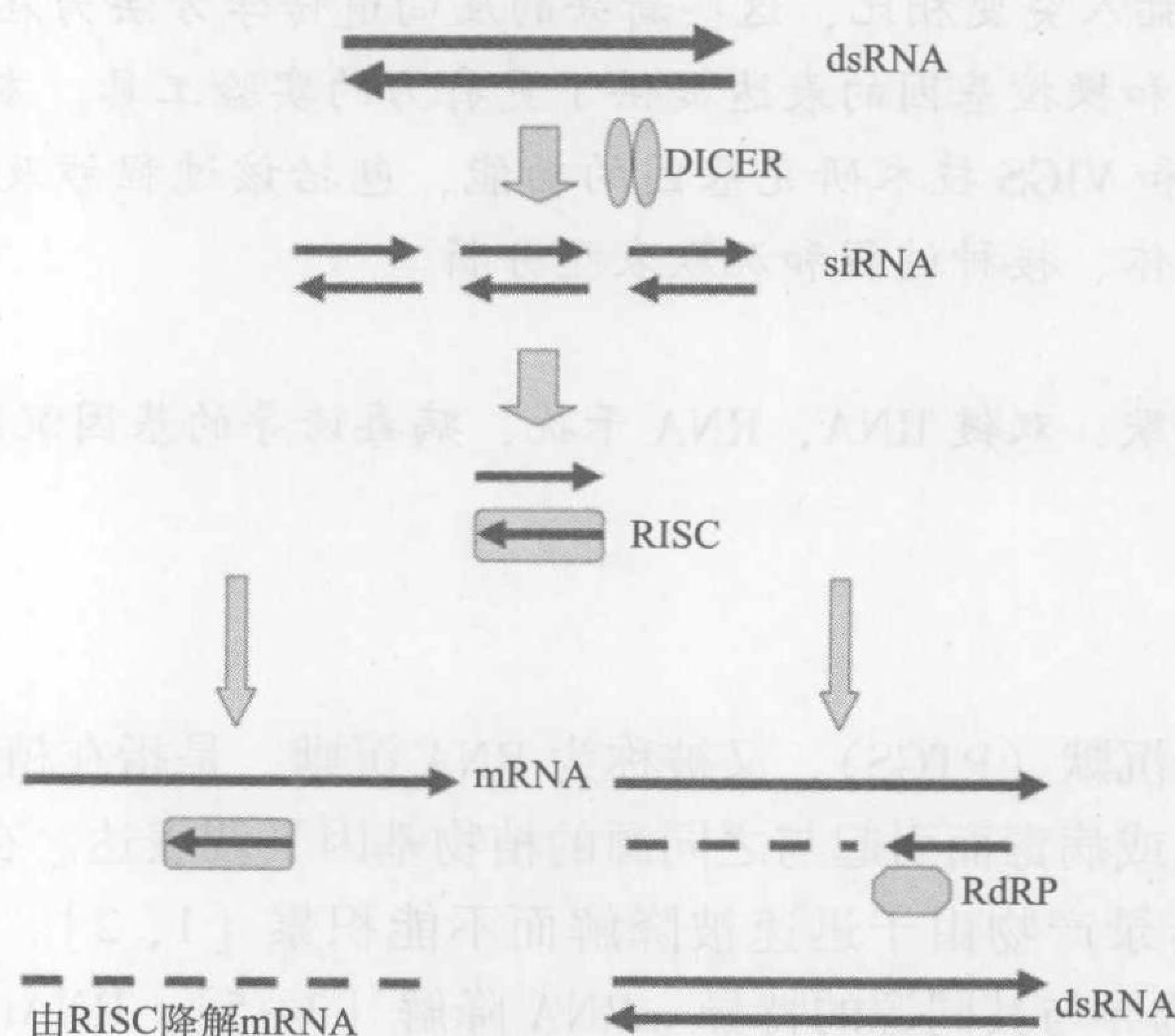


图 12.1　RNAi 机制模式图。在细胞质中，Dicer 将 dsRNA 剪切成长度为 21～25 nt 的 siRNA。siRNA 被整合到 RNA 介导的沉默复合物（RISC）中，在 siRNA 反义链的引导下，识别和降解靶标 mRNA。siRNA 也能作为引物，在 RdRP 的作用下产生新的 dsRNA，放大沉默信号

与反义 RNA 介导的基因沉默和共抑制相比，RNAi 具有高效、稳定且筛选沉默植物所需时间更短等优点［12］。RNAi 产生的沉默效果几乎与基因敲除一样彻底。反义抑制和共抑制的限速步骤可能是通过植物编码的 RdRP 合成 dsRNA，而由 dsRNA 引发的 RNAi 直接绕过了 dsRNA 合成的步骤。当发生共抑制现象时，借由整合反向重复序列（复合整合模式）而产生 RNA 沉默的转基因植物，也能以通读方式从一个 T-DNA 拷贝转录到另一个 T-DNA 拷贝而产生 dsRNA。或者，与靶标 RNA 同源的反向重复序列转录

所产生的外源基因，通过分子内的碱基配对产生dsRNA，这比只用正义或反义RNA的基因沉默效果更好。目前，这一类产生自我互补转录产物的重组载体被广泛用于植物功能基因组研究［12，19，20］。RNAi往往能稳定遗传，因此可以在后代中对其进行研究［21］。Stoutjesdijk和Travelle等［20，22］分别在拟南芥和小麦中进行研究，结果表明用于RNAi的重组载体产生的表型变化能稳定遗传几代。因此，这种方法不仅为功能基因组学研究提供了可靠的工具，也为农作物目标性状的遗传改良提供了可靠的方法。例如，用RNAi研究*VRN2*和*VRN1*，二者转录水平降低，分别是加速或推迟冬小麦的开花起始时间［23，24］。与以突变为基础的反向遗传学方法相比，RNAi的优点还表现在它能通过靶向基因中特异的或者共有的序列，沉默单基因、多基因、多基因家族中所有基因，或多倍体中的多基因拷贝［22，25，26］。另外，与插入突变相比，RNAi能通过使用特殊的启动子驱动hpRNA表达，而在特定组织中实现基因沉默。相应的，利用可诱导的RNAi系统灵活地控制基因失活的时间和程度，可以在植物发育的特殊阶段实现基因沉默，并且在不使用诱导子的情况下［27，28］使基因沉默得到恢复。

通过粒子轰击、农杆菌介导的渗透、病毒侵染等方式，禾谷类作物可以实现瞬时或稳定的RNAi。有研究结果表明，用粒子轰击的方式将特异dsRNA导入大麦和小麦的单个表皮细胞中，能瞬时干扰基因的功能［1，29，30］。在禾谷类作物中，另一种有效沉默基因的方法是VIGS［31］。这种方法采用改造的病毒侵染植物，病毒中含有的植物基因片段的转录产物能使目的基因瞬时失活［32~34］。病毒RNA在自我复制中产生dsRNA。由于可将转录产物直接侵染成株，VIGS不仅在遗传转化费时的植物转化研究中特别有效，而且在植物看家基因、胚发育（敲除导致胚致死的基因）关键基因的研究中也极其有用。通过简单的摩擦，即可将VIGS载体中可侵染的转录产物导入植物，因此，VIGS同样适用于基因的高通量筛选。但利用VIGS做高通量筛选时，需要将每一个构建进行体外转录，这可能相当昂贵。在双子叶植物中，许多病毒被用作VIGS的载体［32，35，36］，而单子叶植物的VIGS只能利用大麦条纹花叶病毒BSMV作为载体，且只能用于大麦和小麦两种寄主植物［33，34，37］。通过沉默八氢番茄红素脱氢酶（PDS）基因，VIGS系统得到优化。*PDS*基因沉默表型为叶片白化，这为VIGS沉默系统提供了一种便捷的、可见的报告因子。最近，在大麦中运用VIGS方法，证明了转录因子*HvWRKY1*和*HvWRKY2*是毒性白粉菌（*Blumeria graminis*）诱导植物防卫反应的抑制因子［38］。不久前，Ding等［39］克隆并改造了一种VIGS病毒，其来源于高羊茅（*Festuca arundinacea* Schreb.）（无芒雀麦花叶病毒，BMV），在实验室接种大麦、水稻和玉米，产生系统花叶症状。另外，BMV没有已知的昆虫介体，也不通过种子传播，增加了该系统的安全性。上述内容介绍了RNAi和VIGS在单细胞研究中的优点，若用于分析整个组织基因功能，或者研究植物中稳定遗传改变的试验，RNAi诱导基因沉默系统仍然是首选的方法。

含有基因表达盒的RNAi和VIGS越来越多地应用于反向遗传学研究，作为研究方法的一部分用以鉴定基因功能。研究证明，在多种植物体系中，它们可有效地干扰基因表达，包括水稻［26］、大麦［29，30，33］和小麦［22，34，40］等禾谷类作物。在燕麦中，至今尚无RNA沉默的研究报道。RNAi作为一种研究植物功能基因组的工具，

确切地说，第一次大规模地使用是在拟南芥和玉米研究中，超过100个目的基因被沉默［41］。研究的关键一直集中在设计和构建可用的质粒载体，以便引发RNAi的外源基因能稳定地整合到染色体组中。本章将介绍目前在大麦和小麦中，下调基因表达所使用的RNAi和VIGS等多种方法。相对而言，虽然RNA基因沉默已是一项广泛应用的技术，但是，在植物研究中对其进行优化的报道相对较少。一段给定的序列能否产生RNA诱导目的基因的基因沉默，这其中有许多可能的因素参与作用。通常使用“21bp法则”［5，42］预测给定的反向序列（IR）是否会靶向目的基因，即21个核苷酸的100%同源足以引发基因沉默。Travella等［22］证明在六倍体小麦中，RNAi对三个同源基因有等量的沉默效果，这三个同源基因的编码区有99%的核苷酸同源性［43］。McGinnis等的主要研究方向是玉米染色体中具有序列同源性的相关基因家族，他们最近的研究却表明［41］，即使目的基因与它们各自的IR序列有90%同源性，且至少有3个21 bp区域完全与IR同源，目的基因稳定状态的RNA含量并不降低。这一发现证明，序列同源性不是决定IR序列是否能诱导目的基因mRNA降解的唯一因素，其他因子也能起作用。需要做更多的试验，以明确哪一种特征特性可用于模拟和预测植物中给定反向重复序列的沉默效应。

2 材料

2.1 RNA干扰

2.1.1 发夹RNA（hp-RNA）载体的构建

（1）用聚合酶链反应（PCR）扩增300~600 bp的目的基因，所使用的正向引物在5′端添加*Bam*HⅠ酶切位点，反向引物在5′端添加*Bgl*Ⅱ酶切位点（当采用PAHC17载体时［44］）。

（2）用PCR扩增300~600 bp的内含子序列，所使用的正向引物5′端添加*Bgl*Ⅱ酶切位点，反向引物5′端添加*Bam*HⅠ酶切位点。内含子序列要被克隆到目的基因的正向与反向序列之间从而形成hp-RNA结构。添加的酶切位点保证克隆的方向性（见注1）。

（3）PAHC17载体［44］，含有玉米*ubi-1*启动子和胭脂碱合酶终止子（*nos*）（引物上含有限制性酶切位点，如果使用其他载体如pStarling和pStargate，请查看网址http://www.pi.csiro.au/RNAi/vectors.htm）。

（4）克隆PCR产物的pGEM-T载体（Promega）

（5）PCR纯化试剂盒或柱子（Promega或其他公司）

（6）DNA模板（20 ng）

（7）引物（各10 μmol/L）

（8）dNTP混合物（10 mmol/L）

（9）*Taq* DNA聚合酶（Sigma）及配套缓冲液

（10）合适的限制酶（购于Promega、NEB等公司）

（11）含有相应抗生素的LB培养基（液体和固体）

2.1.2 RNAi转基因植物的产生

（1）选择合适的转化体系（粒子轰击或农杆菌转化）（见引言）。

（2）hpRNA质粒与另一个包含有选择标记的质粒共转化（见第3章）。

（3）转化植物的再生与选择参见本卷其他部分的描述（见第5~11章）。

（4）转基因植物的分子鉴定（见第13、第14章）（见第四篇"转基因植株的鉴定"）。

2.2 病毒诱导的基因沉默（VIGS）

2.2.1 BSMV衍生载体的构建

（1）在大麦和小麦中进行基因沉默所使用的VIGS载体是基于γRNA的BSMV载体［37］（见注2和图12.2）。

（2）扩增300~600 bp目的基因序列的PCR引物要在正向和反向引物的5′端分别添加*Not* Ⅰ和*Pac* Ⅰ酶切位点。

（3）用*Not* Ⅰ和*Pac* Ⅰ酶切PCR产物并插入到γbPDS4［37］中；含有*PDS*（八氢番茄红素脱氢酶）基因的载体同样用*Not* Ⅰ和*Pac* Ⅰ酶切。

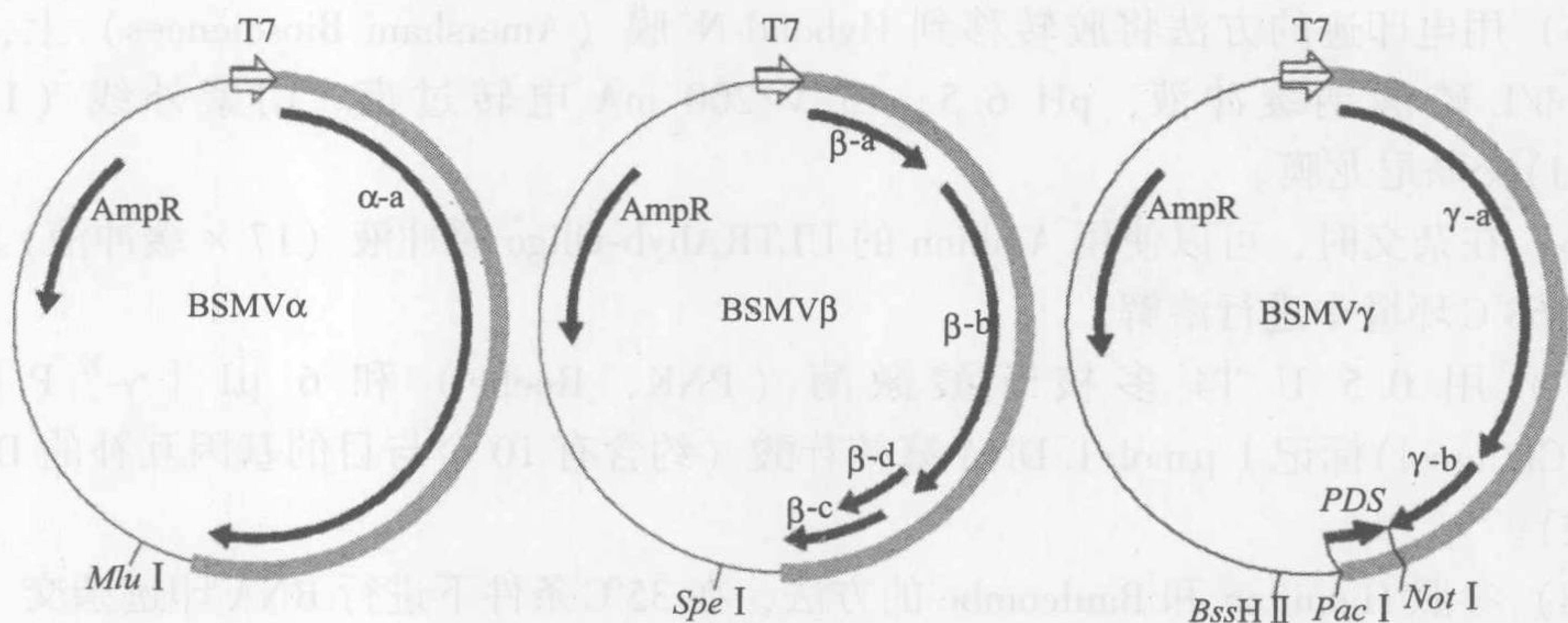


图12.2 大麦条纹花叶病毒（BSMV）基因组构造。由α、β和γ RNA构成三元基因组。与目的基因同源的片段被克隆到γb可读框终止密码子的下游。可选择的酶切位点的位置如图所示

2.2.2 病毒RNA体外转录

使用mMessage mMachine T7体外转录试剂盒（Ambion）合成体外转录产物，并按照产品说明书制备包含有三元BSMV基因组的三个线性质粒（用*Mlu* Ⅰ消化pBSMVα，用*Spe* Ⅰ消化pBSMVβ，用*BssH* Ⅱ消化含有与目的基因同源的片段的pBSMVγb）。

2.3 实时定量PCR

（1）使用TRIzol试剂（Invitrogen Life Technology）提取叶片或其他组织材料的总

RNA。遵守 RNA 提取常规规范，避免核糖核酸酶污染（见注 3）。

（2）取 10 μg 总 RNA 进行反转录。

（3）加入 Oligo（dT）$_{21}$ 引物 0.07 μg。

（4）反转录酶（7 U）（Invitrogen Life Technologies，Basel，Switzerland）及 1×配套缓冲液

（5）dNTP（每个反应 0.7 mmol/L）

（6）dTT（10 mmol/L）及 1.5 U 的 RNase 清除剂（Invitrogen Life Technologies，Basel，Switzerland）

2.4　小干扰 RNA 检测

（1）用含有 0.5 mol/L 氯化钠的 10% 聚乙二醇 8000［14］沉淀大分子质量 RNA（见注 4），回收上清中的小分子质量 RNA。

（2）真空干燥 7 μg 小分子质量 RNA 碎片，干燥产物重悬于 10 μl 上样缓冲液（95% 甲酰胺、20 mmol/L EDTA pH 8.0、0.05% 溴酚蓝、0.05% 二甲苯氰）。

（3）将 RNA 样品在 95℃ 加热 5 min，冰上预冷后可上样。

（4）将 RNA 样品进行电泳检测。凝胶包含 15% 聚丙烯酰胺、7 mol/L 尿素、1 × TBE，pH 8.5。20 cm 凝胶使用的电泳参数为 260 V/47 mA（见注 5）。

（5）用电印迹的方法将胶转移到 Hybond-N$^+$ 膜（Amersham Biosciences）上，使用 25 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 6.5，15 V/200 mA 电转过夜。用紫外线（1200 ~ 2400 μJ）交联尼龙膜。

（6）在杂交时，可以使用 Ambion 的 ULTRAhyb-Oligo 缓冲液（17 × 缓冲液）。使用前需在 68℃ 环境中进行溶解。

（7）用 0.5 U T4 多核苷酸激酶（PNK，Roche）和 6 μl［γ-^{32}P］ATP（5000 Ci/mmol）标记 1 μmol/L DNA 寡核苷酸（约含有 10 个与目的基因互补的 DNA 寡核苷酸）。

（8）参照 Hamilton 和 Baulcombe 的方法，在 35℃ 条件下进行 RNA 印迹杂交［14］。

3.　方法

3.1　筛选目的基因片段的参数

3.1.1　序列

（1）构建一个指定的 RNA 沉默载体首先要进行生物信息学分析。根据目的基因对应的已知 cDNA 序列或预测的基因序列设计引物，用反转录-PCR（RT-PCR）方法扩增 cDNA 上的一部分序列。如果没有目的基因的基因组序列，可以用其他物种中基因的序列去搜索已知序列的 cDNA。如果目的基因是多基因家族的成员，就需要与家族成员进行多重比较以指导 PCR 引物的设计。要扩增的基因区域以及它与其他基因的相似性决定了该 RNAi 载体靶向单个 mRNA 还是多个相关基因的转录产物。

（2）扩增编码区和非编码区（UTR）都能获得好的沉默效果。由于沉默机制依靠序列同源性，因此相关的 mRNA 序列有可能被交叉沉默。如果没有特殊要求，应选择与其他序列同源性较低的序列，如 5′或 3′UTR。为减少交叉沉默，应避免选择与目的基因以外的序列有大于 20 个碱基一致性的区段构建载体。

（3）目前已经有标准的软件能帮助检测序列同源性，以精确、系统地评估并最大限度地减少 siRNA 序列和目的基因之间 RNAi 脱靶情况的发生［45］（见注 6）。

（4）除了基因的编码区以外，截短的启动子表达的 dsRNA 也能诱导基因抑制。这种方式诱导转录水平基因沉默（TGS）［46，47］。

3.1.2　大小

范围在 50~1000 bp 之内的基因片段已经被成功地用作基因沉默的靶标。正确选择片段长度时需要考虑两个因素：片段越短，则沉默的频度越低；发夹越长，在细菌寄主中发生重组的概率越大。为了达到最优化的沉默效率，我们推荐使用 300~600 bp 片段长度。

3.2　RNAi

发夹 RNA 载体（hpRNA）的产生

构建 hpRNA 的方法有多种。可以利用标准的植物转化载体进行构建，这种方法需要将每个目的基因对应的发夹编码结构都重新构建到载体上。另外，可以使用通用的基因沉默载体，如由 CSIRO（澳大利亚）开发的用于谷物转化的 pStarling 和 pStargate 系列载体（http://www.pi.csiro.au/RNAi/vectors.htm）。只需要通过传统的克隆（pStarling）方法或使用 Gateway 定向重组系统（pStargate）将目的基因的 PCR 衍生物克隆到上述载体即可。

克隆与目的 mRNA 同源的 cDNA 片段

（1）RT-PCR 实验中使用的引物需要添加 *Bam*HⅠ和 *Bgl*Ⅱ限制酶酶切位点，用来扩增与目的基因序列一致的、300~600 bp 的片段。*Bam*HⅠ和 *Bgl*Ⅱ作为同尾酶，二者酶切产生的片段末端彼此兼容。该操作保证基因片段能被有方向性地克隆到 pAHC7 载体唯一的 *Bam*HⅠ位点［17］。

（2）内含子片段的克隆策略与上述目的基因的克隆策略相同。

（3）PCR 扩增所采用的程序：94℃变性 45 s、62℃退火 45 s、72℃延伸 90 min，共扩增 35 个循环。

（4）以 cDNA 片段为模板扩增的产物经 *Bam*HⅠ和 *Bgl*Ⅱ酶切后被克隆到 pAHC17 质粒的 *Bam*HⅠ特异性限制位点（见注 7 和图 12.3）。

（5）反向重复序列组装完成后即可克隆到合适的双元载体上，用于农杆菌介导的植物转化。

pSTARLING 载体

（1）如果将多个目的基因逐一进行沉默将是一件很费力的工作。研究发现 pSTAR-

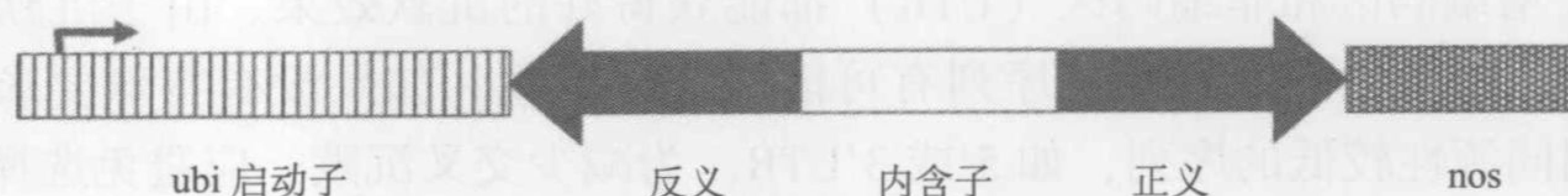


图 12.3　转基因实验中所使用的发夹结构载体构建图谱。基因特异性序列（黑色箭头指示方向）被正向和反向克隆到一段内含子序列的两侧，由组成型的 *ubi* 启动子（阴影框）启动，由胭脂碱合酶终止子（黑点框）终止

LING 系统转化效率非常高，并且适用于同时沉默少量几个基因。

（2）该载体采用玉米泛素启动子驱动发夹 RNAi 产物在单子叶植物中高水平地组成性表达。

（3）用传统的限制酶酶切和 DNA 连接技术可将 PCR 片段插入到载体上，反向片段插入到 *Bam*HI. *Pac*I. *Asc*I多克隆位点，正向片段插入到 *Spe*I. *Sna*BI. *Kpn*I多克隆位点。

pSTARGATE 载体

（1）该载体可以作为另外一种高通量载体 pSTARLING 的替代产品，采用了商品化可用的 Gateway 克隆系统（http://www.Invitrogen.com），能沉默大量的基因（如一个基因家族成员或一个通路的成员）。

（2）该载体也能实现方向性克隆。该体系含有的阴性选择标记（*ccdB*）能筛选掉无重组反应的载体，并高效地获得重组质粒。

（3）pSTARGATE 载体包含两个重组盒，在反向重复镜像中包含 *attP*1-*ccdB*-*attP*2 或 *attR*1-*ccdB*-*attR*2，因此当基因片段侧翼含有合适的 *att* 位点时能与载体发成重组产生 ihpRNA 编码的结构。

构建的质粒载体的鉴定

（1）将扩增的所有 cDNA 片段亚克隆到 pGEM-T 载体。

（2）连接产物转化 *E. coli*，并筛选具有氨苄抗性的克隆，用少量细菌培养液提取质粒 DNA，用限制酶酶切图谱鉴定重组质粒。

（3）为确定克隆的 DNA 片段正确，每一个最终的载体都需要进行 DNA 测序。因为在大工程中存在一个潜在的问题，即大量 cDNA 片段可能被平行克隆并且发生混合。

（4）每个构建均要进行完整的反向序列片段测序，并将产生的序列和目的基因序列比对之后才能最终确定。

沉默表型的检测

（1）不同的 hpRNA 转基因株系因为干扰效果的不同会产生一系列程度不同的缺陷表型［22，48］。

（2）由于 RNAi 干扰效果有很大的不同（微弱、中等、强），靶 mRNA 的水平变化可以从与野生型一致到完全检测不到（见注 8）。

3.3　VIGS

3.3.1　VIGS 接种技术

（1）BSMV 基因组中每一种转录产物（野生型的或经过遗传改造的）以 1∶1∶1

比例混合，并加入接种缓冲液 FES［49］。

（2）将混合物摩擦接种于生长 7 天的植物。戴上手套后，吸取混合物放置于并拢的拇指和食指中间。

（3）用另一只手握住植物的基部，用戴手套的食指和拇指轻轻挤压第一叶和第二叶。

（4）并拢的手指轻轻地从基部到尖部滑动两次之后，整个叶片表面均涂满混合物。

3.3.2　用 BSMV 沉默内源的大麦或小麦 *PDS* 基因

（1）将野生型 BSMV 质粒、βRNA 质粒、不携带植物序列的（BSMV：00）或含有 *PDS* 片段的 γRNA 衍生物质粒的体外转录产物以 1∶1∶1 比例混合接种于温室生长的大麦和小麦幼苗。

（2）用 BSMV-PDS 摩擦接种生长 7 天的幼苗的第一叶和第二叶，7 天后，大麦的第三叶和第四叶首次出现明显的白化症状。在小麦中白化现象也发生，但要到病毒接种第 10 天以后才可见（见注 9 和注 10）。

3.3.3　用 BSMV-VIGS 方法鉴定 R 基因介导的抗病通路中所需要的基因

BSMV 侵染后启动 VIGS，而病原菌侵染后启动植物抗性系统。通常二者存在必要的时间间隔且间隔时间一般是 8 天。

3.4　目的基因 mRNA 下调检测

3.4.1　实时定量 PCR

（1）为了确定 RNA 诱导的外源基因是否影响目的基因的 mRNA 水平，采用两对引物进行定量 RT-PCR 检测。一对引物是特异性地针对目的基因 mRNA 而设计的，用于检测有效的内源 mRNA 水平而非外源基因的转录产物水平。

（2）第二对引物扩增与靶标 RNA 沉默无关的一个内参基因，如被用作内参的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因（*GAPDH*，AF251217）。

（3）为验证试验可重复性，每个 RNA 样品进行三个重复（三个 cDNA）。

（4）可以用 ABI PRISM7700 序列检测系统（Applied Biosystems）及 SYBR Green PCR 检测混合物（Applied Biosystems）进行实时 PCR 检测。在终体积 26 μl 的反应体系中加入 cDNA 模板以及合适的引物。扩增条件：50℃，2 min；95℃，10 min；95℃，15 s、60℃，1 min，40 个循环。

3.4.2 小干扰 RNA 检测

（1）用看家基因 *GAPDH*（AF251217，甘油醛-3-磷酸脱氢酶）作为对照进行杂交。

（2）转基因植物与野生型植物中杂交信号的相对强度可以用磷屏（phosphoimager）（Cyclone gene array system，Perkin-Elmer，Boston）检测。

4. 注释

注 1：在细菌中通过“空白”区域将自我互补的区域隔开，获得稳定的反向重复序列。如果间隔序列编码内含子，基因沉默效率会非常高，确保由目的基因构建的转化子可以 100% 地引起不同程度的基因沉默［12］。

注 2：BSMV 是大麦病毒家族的典型成员，它是正义单链 RNA 病毒，由 α、β 和 γRNA 组成三元基因组。选择植物中需要被沉默的目的基因的转录序列片段插入到 DNA 质粒中，可以通过体外转录合成 γRNA。植物 cDNA 片段被克隆到 γb 可读框终止子的下游（图 12.2）。

注 3：在一般情况下，制备的 RNA 越纯（即无蛋白质、碳水化合物等），RNA 电泳的效果越好。

注 4：如果 RNA 浓度足够高，会立即产生肉眼可见沉淀；否则，将样品冰浴 30 min 也可以促进 RNA 沉淀。用 50% 甲酰胺溶液代替水配制 10% PEG/0.5 mol/L 氯化钠溶液更有助于 RNA 沉淀。

注 5：溴酚蓝恰好到达凝胶底部前停止电泳。此时 siRNA 跑到凝胶下部 2/3 或 3/4 处。

注 6：最近，一些商业化的 siRNA 供应公司（如 Dharmacon、Qiagen、Proligo、Ambion 和 Invitrogen 公司），以及一些学术机构（如 Cold Spring Harbor 和 Whitehead Institude），相继开发了专门的 siRNA 搜索程序。读者可以通过他们的网站访问这些程序。

注 7：每个 RNAi 结构包含一个目的基因的 cDNA 片段，但是在 5′和 3′端的正义和反义方向不同，由选择的内含子隔开（图 12.3）。

注 8：在转基因植株中观察到的沉默程度是多样化的，包括功能降低或功能缺失，这对于发现新基因和进行功能基因组学研究可能是一个有用的特征。完全沉默编码基本细胞功能的重要基因或细胞特殊发育阶段的关键基因可能导致植物死亡，而这些基因的降低表达可能引起可见的植物表型，揭示目的基因的作用。

注 9：与大麦相比，小麦中的白化表型通常表现为条纹状而不是整张叶片都白化［34］。

注 10：与大麦相比，BSMV：00 对照病毒在小麦中引起的相关症状较轻。不同基因型的大麦对 BSMV 侵染的感病性不同，然而不同品系的小麦一致地易于 BSMV-VIGS 侵染。

（陈　蕾　译）

参考文献

1. Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P. and Dudler, R. (2000) Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J.* 24, 895-903.

2. Kanno, T., Naito, S. and Shimamoto, K. (2000) Post-transcriptional gene silencing in cultured rice cells.

Plant Cell Physiol. 41, 321-326.

3. Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans. Nature* 391, 806-811.
4. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000) RNAi : double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
5. Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
6. Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
7. Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling - transient inactivation of gene-expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343-3353.
8. Waterhouse, P. M., Graham, M. W. and Wang, M. -B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *P. N. A. S. USA* 95, 1395913964.
9. Goldoni, M., Azzalin, G., Macino, G. and Cogon, C. (2004) Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa. Fungal Genet. Biol.* 41, 1016-1024.
10. Hammond, S. M., Caudy, A. A. and Hannon G. J. (2001) Post-transcriptional gene silencing by double stranded RNA. *Nature Rev. Genetics* 2, 110-119.
11. Baulcombe, D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 109-113.
12. Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G. and Water-house, P. M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320.
13. Rothstein, S. J., DiMaio, J., Strand, M. and Rice, D. (1987) Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *P. N. A. S. USA* 84, 8439-8443.
14. Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
15. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
16. Hamilton, A. J., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. C. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671-4679.
17. Lipardi, C., Wei, Q. and Paterson, B. M. (2001) siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107, 297-307.
18. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L. Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. A. and Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
19. Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. and Waterhouse, P. M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581-590.
20. Stoutjesdijk, P. A., Singh, S. P., Liu, Q., Hurlstone, C. J., Waterhouse, P. A. and Green, A. G. (2002) hp-RNA-mediated targeting of the *Arabidopsis FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol.* 129, 1723-1731.
21. Carthew, R. W. (2001) Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 244-248.

22. Travella, S., Klimm, T. E. and Keller, B. (2006) RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. *Plant Physiol.* 142, 6-20.
23. Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V. and Dubcovsky, J. (2004) The wheat*VRN*2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303, 1640-1644.
24. Loukoianov, A., Yan, L., Blechl, A., Sanchez, A. and Dubcovsky, J. (2005) Regulation of *VRN*-1 vernalization genes in normal and transgenic wheat. *Plant Physiol.* 138, 2364-2373.
25. Lawrence, R. J. and Pikaard, C. S. (2003) Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. *Plant J.* 36, 114-121.
26. Miki, D., Itoh, R. and Shimamoto, K. (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol.* 138, 1903-1913.
27. Guo, H. S., Fei, J. F., Xie, Q. and Chua, N. H. (2003) A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant J.* 34, 383-392.
28. Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P. and Helliwell, C. (2005) A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnol. J.* 3, 583-590.
29. Christensen, A. B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjr, M. F., Dudler, R. and Schweizer, P. (2004) The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 109-117.
30. Douchkov, D., Nowara, D., Zierold, U. and Schweizer, P. (2005) A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 755-761.
31. Dinesh-Kumar, S. P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M. and Liu, Y. (2003) Virus-induced gene silencing. *Methods Mol. Biol.* 236, 287-294.
32. Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B. and Dinesh-Kumar, S. P. (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* 39, 734-746.
33. Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I. E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K. and Lacomme, C. (2005) Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol.* 138, 2155-2164.
34. Scofield, S. R., Huang, L., Brandt, A. S. and Gill, B. S. (2005) Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr*21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiol.* 138, 2165-2173.
35. Tao, X. and Zhou, X. (2004) A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant J.* 38, 850-860.
36. Zhang, C. and Ghabrial, S. A. (2006) Development of *Bean pod mottle virus*-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology* 344, 401-411.
37. Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C. and Pogue, G. P. (2002) *Barley stripe mosaic virus*-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* 30, 315-327.
38. Shen, Q.-H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., ülker, B., Somssich, I. E. and Schulze-Lefert, P. (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315, 1098-1103.

39. Ding, X. D., Schneider, W. L., Chaluvadi, S. R., Mian, M. A. R. and Nelson, R. S. (2006) Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1229-1239.

40. Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. (2005) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large bowel health in rats. *P. N. A. S. USA* 103, 3546-3551.

41. McGinnis, K., Murphy, N., Carlson, A. R., Akula, A., Akula, C., Basinger, H., Carlson, M., Hermanson, P., Kovacevic, N., McGill, M. A., Seshadri, V., Yoyokie, J., Cone, K., Kaeppler, H. F., Kaeppler, S. M. and Springer, N. M. (2007) Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. *Plant Physiol.* 143, 1441-1451.

42. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. and Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnol.* 22, 326-330.

43. Kimbara, J., Takashi, R. and Nasuda, S. (2004) Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome Res.* 12, 703-714.

44. Christensen, A. H., Sharrock, R. A. and Quail, P. H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.

45. Qiu, S., Adema, C. M. and Lane, T. (2005) A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acid Res.* 33, 1834-1847.

46. Cigan, A. M., Unger-Wallace, E. and Haug-Collet, K. (2005) Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. *Plant J.* 43, 929-940.

47. Yan, H., Chretien, R., Ye, J. and Rommens, C. M. (2006) New constructs approaches for efficient gene silencing in plants. *Plant Physiol.* 141, 1508-1518.

48. Chuang, C. F. and Meyerowitz, E. M. (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana. P. N. A. S. USA* 97, 4985-4990.

49. Pogue, G. P., Lindbo, J. A., Dawson, W. O. and Turpen, T. H. (1998) Tobamovirus transient expression vectors: tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants, in*Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S. B. and Schilperoot, R. A., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-27.

39. Ding, X. D., Schneider, W. L., Chaluvadi, S. R., Mian, M. A. R. and Nelson, R. S. (2006) Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1229-1239.
40. Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. (2005) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large bowel health in rats. *P. N. A. S. USA* 103, 3546-3551.
41. McGinnis, K., Murphy, N., Carlson, A. R., Akula, A., Akula, C., Basinger, H., Carlson, M., Hermanson, P., Kovacevic, N., McGill, M. A., Seshadri, V., Yoyokie, J., Cone, K., Kaeppler, H. F., Kaeppler, S. M. and Springer, N. M. (2007) Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. *Plant Physiol.* 143, 1441-1451.
42. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. and Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnol.* 22, 326-330.
43. Kinjo, J., Takashi, H. and Naoki, S. (2004) Characterization of the genes encoding for MADS homologues in wheat. *Chromosome Res.* 12, 703-714.
44. Christensen, A. H., Sharrock, R. A. and Quail, P. H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.
45. Qiu, S., Adema, C. M. and Lane, T. (2005) A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acid Res.* 33, 1834-1847.
46. Cigan, A. M., Unger-Wallace, E. and Haug-Collet, K. (2005) Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. *Plant J.* 43, 929-940.
47. Yan, H., Chretien, R., Ye, J. and Rommens, C. M. (2006) New construct approaches for efficient gene silencing in plants. *Plant Physiol.* 141, 1508-1518.
48. Chuang, C. F. and Meyerowitz, E. M. (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *P. N. A. S. USA* 97, 4985-4990.
49. Pogue, G. P., Lindbo, J. A., Dawson, W. O. and Turpen, T. H. (1998) Tobamovirus transient expression vectors: tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants. *inPlant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S. B. and Schilperoot, R. A., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-27.

第四篇　转基因植株的鉴定

第13章 基因插入位点和模式

Philippe Vain Vera Thole

摘 要：在过去的25年里，转基因植株中外源基因插入模式和位点的研究，极大地有助于人们认识植物核基因组中外源基因的整合、表达和稳定遗传的机理。同时，分子鉴定对于转基因作物的安全评估也是一个必要的步骤。因此，本章主要介绍通过根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）介导转化，或外源DNA直接转化方法所获得转基因禾谷类作物和牧草中，外源基因插入模式和位点数目的标准分析流程及鉴定方法。基因组中外源基因的数目和分布情况，主要通过遗传研究、PCR和Southern分析相结合的方法进行鉴定。但是，仅仅依靠这些方法，并不足以完全掌握外源基因在植物中的分布情况，如要进行精确鉴定，还需借助其他试验方法的综合分析。本章并未对这些额外方法进行详细描述，仅提供相关书籍以供读者参阅。

关键词：转基因拷贝数，转基因位点，基因组DNA，PCR反应，Southern分析，遗传，分离。

1. 引言

每一次独立的转化事件或采用不同的转基因策略，都会导致植物基因组中外源基因插入模式和位点数目的差异。在过去的30年里，农杆菌介导的转化方法是植物转基因技术的主流［1］。20世纪80年代，其首先应用于双子叶植物的转化［2］；90年代，在单子叶植物的转化中获得成功［3］。此外，基因枪［6，7］和原生质体转化技术［4，5］，对于转基因技术基础和应用研究也是重要的补充［8］。目前，除了一些依靠小片段同源序列相关的整合方法外［9］，大多数植物核基因组的转化方法主要依赖于外源基因的随机插入。因此，外源基因在植物核基因组中的插入位点和整合方式大都是不清楚的。从过去获得的大量转基因事件的分析，如T-DNA插入系，人们发现外源基因倾向于整合到基因富集区；然而，这可能仅仅是因为转基因过程中选择标记基因必须正常行使功能才能得到转基因植株。

由于外源DNA只整合到单个或多个不连锁的孟德尔位点，由农杆菌介导转化技术获得的转基因植株，一般含有较少的外源基因拷贝数，并且发生染色体重排的概率也非常有限，因此，其非常适合于构建可稳定遗传的转基因植物群体。同时，新一代双元载体的应用还限制了多余DNA片段，如载体本身的骨架序列［10］，或非植物来源的DNA片段［11］转入植物基因组的可能性。而采用直接的转化技术时，其获得的转基因植株所含外源DNA片段经常会在单个孟德尔遗传位点形成很多的复杂插入［12，

13]，从而影响人们对转基因技术的有效控制。最近，基因枪技术有所改进，当采用不含骨架序列和低丰度的去磷酸化的线性 DNA 片段进行直接转化时，发现外源 DNA 片段在插入位点处所形成的结构获得了明显的改善。但是，对转基因插入位点处进行测序鉴定后，发现改进的基因枪技术会引起频繁的小范围重排，导致产生多个新的可读框，以及增加叶绿体 DNA 和外源基因共整合的频率。

本章列举了两例转基因事件，对不同的转基因方法加以说明。这两例事件采用的载体均为双元载体：选择性标记基因潮霉素基因和报告基因 β-葡萄糖醛酸酶基因位于同一个 T-DNA 区。一个转化采用的是粒子轰击法（基因枪法，称为事件 1），另一个采用农杆菌介导转化方法（称为事件 2）。为了确保其能在植物核基因组中顺利表达，外源基因的两端分别加上了启动子和终止子，同时假设其在质体基因组中不会发生插入和表达。

2. 研究材料

2.1 遗传研究

2.1.1 耗材和仪器设备

（1）可供植株生长的人工智能气候箱或温室
（2）可控的植物组织培养室（25℃）
（3）37℃温控摇床
（4）超净工作台
（5）立体显微镜（Leica MZ6）
（6）PCR 仪
（7）凝胶成像分析仪（Bio-Rad）
（8）水平电泳仪
（9）真空箱
（10）天平
（11）冰箱（4℃冷藏和-20℃冷冻）
（12）微量移液器和配备的吸头
（13）移液管（10 ml 和 20 ml）
（14）冰
（15）液氮
（16）滤纸（如 Whatman）
（17）96 孔、24 孔或者 6 孔的一次性塑料板
（18）微量离心管（0.2 ml、0.5 ml、1.5 ml 和 2 ml）
（19）15 ml 和 50 ml 的离心管
（20）塑料培养皿（直径 9 cm）
（21）解剖刀和镊子

2.1.2 试剂

（1）乙醇（70%）

（2）次氯酸钠（Fluka 71696）

（3）无菌去离子水

（4）MS 培养基：Murashige and Skoog 培养基+维生素 B_5（Duchefa M0231），10 g/L 蔗糖，6 g/L 琼脂粉，2 g/L 植物凝胶，pH5.8

（5）β-葡萄糖醛酸酶基因活性测定液：100 mg X-gluc（$C_{14}H_{13}BrClNO_7$♂$C_6H_{13}N$）溶于 2 ml DMSO（二甲基亚砜），用 10 mmol/L EDTA 定容到 200 ml，0.1% Triton X-100，100 mmol/L Na_3PO_4，pH7.0

（6）植物组织 DNA 提取试剂盒（Qiagen，#69104）

（7）*Taq* DNA 聚合酶（如 GE Healthcare UK Ltd，27-0799-06）和 10×反应缓冲液

（8）dNTP 储存液（2 mmol/L）

（9）引物（10 μmol/L）（如β-葡萄糖醛酸酶基因的正向和反向引物；看家基因的正向和反向引物）

（10）琼脂糖

（11）溴化乙锭：10 mg/ml 储存液

（12）10×TBE 电泳缓冲液：0.89 mol/L Tris-base，0.89 mol/L H_3BO_3，0.025 mol/L EDTA，pH8.3

2.2 Southern 分析

2.2.1 耗材和仪器设备

（1）感光成像仪（如 Typhoon 9200，Amersham Biosciences）

（2）分光光度计和石英比色皿

（3）凝胶成像分析仪（Bio-Rad）

（4）温控摇床 37℃和 65℃

（5）PCR 仪

（6）光密度计（如 Bio-Rad 690）

（7）冰箱（4℃、-20℃和-80℃）

（8）Speedvac DNA110 离心机

（9）水平电泳仪（如 gel tank systems with power supply）

（10）台式振荡器

（11）磷屏（如 Molecular Dynamics）

（12）放射性自显影胶片

（13）DNA 测序服务或设备

（14）尼龙膜（Amersham）

（15）印迹设备（如塑料盘、玻璃板、印迹纸）

（16）研钵、研棒或一次性塑料研棒

（17）塑料离心管（15 ml 和 50 ml）

（18）微型离心管（0. 2 ml、0. 5 ml、1. 5 ml 和 2 ml）

（19）保鲜膜

（20）微量移液器和配备的吸头

（21）移液管（10 ml 和 20 ml）

（22）冰

（23）液氮

2. 2. 2 试剂

（1）植物基因组提取试剂盒（Amersham Biosciences）

（2）植物基因组小量提取试剂盒（Qiagen，#69104）

（3）凝胶回收试剂盒（Qiagen，#28101）

（4）PCR 回收试剂盒（Qiagen，#28104）

（5）限制性内切核酸酶和相应的反应缓冲液

（6）DNA 测序试剂盒

（7）琼脂糖

（8）10×TBE 电泳缓冲液：0. 89 mol/L Tris-base，0. 89 mol/L H_3BO_3，0. 025 mol/L EDTA，pH8. 3

（9）噬菌体 DNA

（10）溴化乙锭（10 mg/ml）

（11）无菌去离子水

（12）DNA 聚合酶Ⅰ，Klenow 片段

（13）［^{32}P］标记的 dCTP（Amersham）

（14）载体 DNA（高压后的鲱鱼精 DNA，5 g/L）

（15）OLB（寡核苷酸标记缓冲液）：2 ml（1. 25 mol/L Tris-HCl，pH8. 0 和 0. 125 mol/L $MgCl_2$），36 μl β-巯基乙醇，10 μl dATP，10 μl dTTP，10 μl dGTP，5165 μl的 2 mol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸（pH6. 6），3099 μl 的 90 OD_{260} U 随机引物/μl

（16）BSA（小牛血清白蛋白，50 mg/ml）

（17）1/10 TE 溶液：3 mmol/L Tris-HCl，pH7. 0 和 0. 02 mmol/L 的 EDTA，pH8. 0

（18）SDS（十二烷基硫酸钠，10% *m/V*）

（19）0. 25 mol/L HCl

（20）0. 4 mol/L 和 3 mol/L NaOH

（21）20×SSC：3 mol/L NaCl 和 0. 3 mol/L $Na_3C_6H_9O_9$，pH7. 0

（22）5× HSB：175. 3 g NaCl，30. 3 g PIPES 和 7. 45 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 用纯水定容至 1 L，后用 NaOH 调至 pH6. 8。

（23）Denhardt 溶液Ⅲ：2 g 明胶，2 g Ficoll-400，2 g 聚乙烯吡咯烷酮 360，10 g SDS、5 g $Na_2P_2O_4 \cdot 10H_2O$，65℃溶于 100 ml 水中。

3. 实验方法

3.1 转基因插入位点的数目

第一代（T_0）转基因植株外源基因的插入位点数目，一般都是通过遗传方法进行鉴定。虽然遗传分析可以在任何世代进行，但是一般选择转基因植株自交，或与野生型测交后得到的第二代（T_1）进行。对 T_1 代转基因植株，统计目的基因表达与不表达的个体，可以获得表型的分离比；而对 T_1 代转基因植株，统计含与不含目的基因的个体，则可以得到群体基因型的分离比。在估测转基因插入数目时，经常会采用前一种方法。但是，通过表型鉴定获得的结果，经常会低于实际情况；通过基因型鉴定所获得的结果，则可以准确判定转基因的插入数目。对 T_0 代及其子代分析结果的比较，同样也可以提供转基因插入位点数的信息。最近几年，精确评估转基因插入数目，对发展“基因清除”技术起了重要作用，这一技术主要是通过多个 T-DNA 区共转化，获得不含任何选择性标记基因的转基因植株。转基因植株中外源基因的插入位点数与外源基因的拷贝数并非完全一致的，因为在同一插入位点有可能会含有多个拷贝，也有可能是以单拷贝的形式插入多个不同的位点。

3.1.1　转基因表型的分离

T_0 代转基因植株自交或杂交可以获得 T_1 代，用 T_1 代植株可以评价外源基因的表达情况。转入植物基因组的任何外源基因都可以用 T_1 代植株的表型来分析，筛选 T_0 代转基因植株的选择性标记基因，也常应用于鉴定 T_1 代转基因植株外源基因的表达。若目标基因的表型容易观测的话，同样也可以用于 T_1 代转基因植株的表型分析，如通过碘染试验可以方便地观测与植物淀粉合成相关基因的表型。卡那霉素和潮霉素等抗生素，也可以分别用于鉴定转基因后代中含有卡那霉素基因和潮霉素基因等相关抗性基因的阳性植株（见注 1）。另外，通过将草丁膦、磺酰脲或草甘膦等除草剂喷洒幼苗或涂叶，也可以快速地鉴定出含有 *BAR*、*ALS* 或 *EPSP* 等功能基因的转基因植株。而 β-葡萄糖醛酸酶基因、*LUC* 和绿色荧光蛋白基因等报告基因通常用于检测 T_1 代植株的外源基因表达。无损伤表型鉴定，如观测绿色荧光蛋白基因或 *LUC* 的表达，优于有损伤表型鉴定，如 β-葡萄糖醛酸酶基因染色或抗性检测，因为前者可用于外源基因未表达的 T_1 代植株的后续分子检测。

在事件 1 和事件 2 中，T_1 代转基因植株由 T_0 代植株自交获得，其 β-葡萄糖醛酸酶基因活性主要通过胚乳、叶片和根的组织化学染色方法测定。

（1）胚乳染色时，种子先用 70% 的乙醇杀菌 30 s，然后用 50% 的饱和次氯酸钠溶液浸洗 15 min，再用无菌去离子水洗三次，第三次漂洗后浸数小时。在超净工作台上用灭过菌的解剖刀将处理好的种子切成两半，含胚的一半种子在 MS 培养基上获得 T_1 代幼苗，另外一半则用来 β-葡萄糖醛酸酶（GUS）染色。经常人们会将胚乳和胚的表型放在一起进行比较，因为它们的基因型虽然相同，但是基因组倍性不同。

（2）对于根和叶的染色，则没有必要对种子进行消毒；当然种子也可以先在 70% 的乙醇中洗 30 s，然后用无菌的去离子水洗三次。对于一些物种，如小麦和大麦，先将种子置于湿润的滤纸上 5℃暗培养 2~4 天，接着在 20~25℃的暗环境下萌发 5 天，然后在同样温度下每天 16 h 光照培养，5~7 天后收集根和叶片。这一方法优于胚乳染色，因为有些物种的种子（如小麦和大麦）对次氯酸钠非常敏感。

（3）根据样品的体积大小，分别将它们浸没在加有 β-葡萄糖醛酸酶反应液的 96 孔、24 孔或 6 孔板上。

（4）样品放在打开的平板上抽真空（71 mm 汞柱）10~15 min，37℃摇床上反应过夜。

（5）第二天，观察 β-葡萄糖醛酸酶染色后的样品。图 13.1 是事例 2 中 T_1 代转基因种子胚乳染色完成后所得的结果。

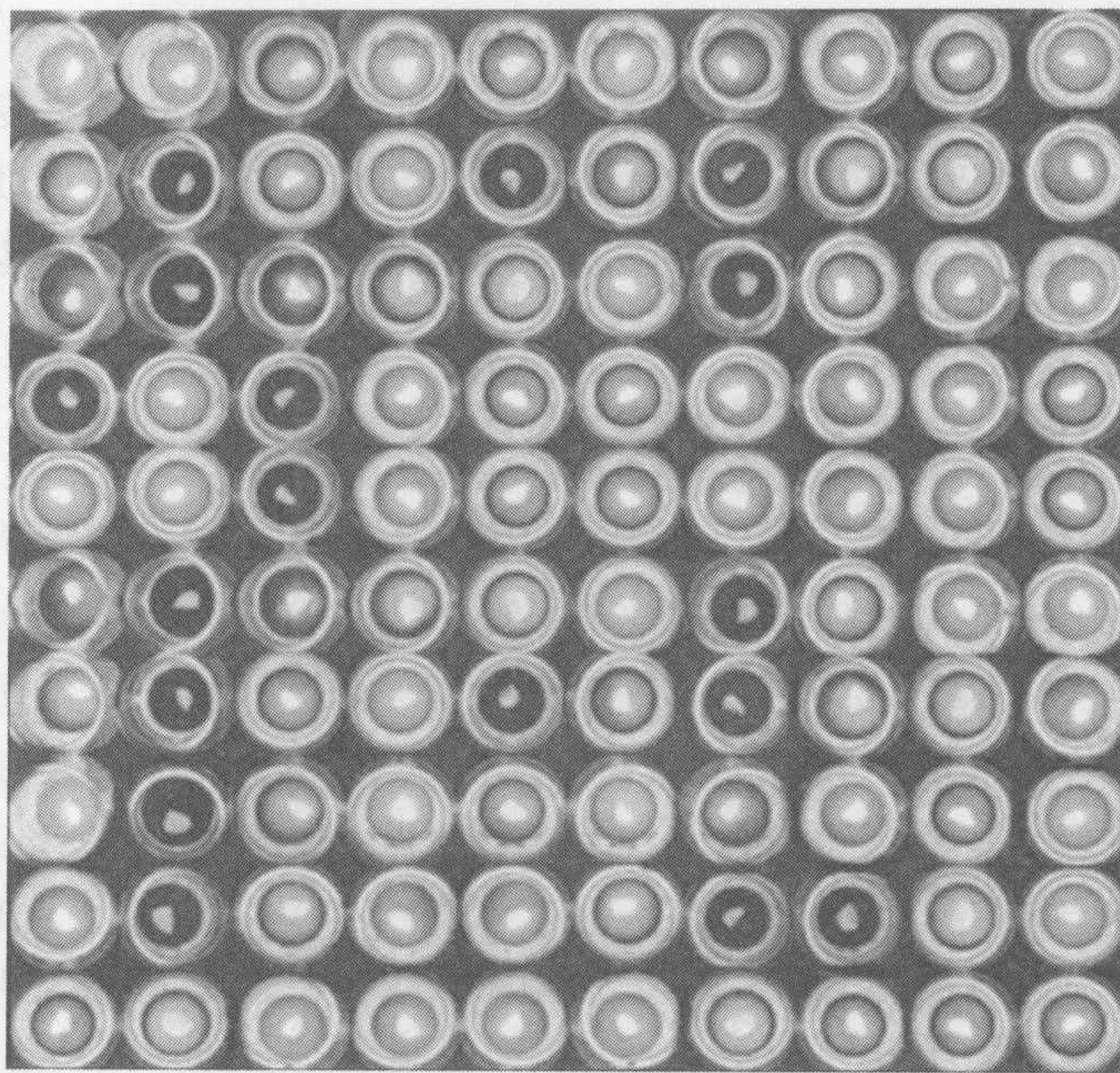


图 13.1 组织化学染色鉴定分离群体中种子胚乳的 β-葡萄糖醛酸酶活性。图示事例 2：100 粒 T_1 代种子中有 83 粒种子具有 β-葡萄糖醛酸酶活性（标为黑色）

（6）转基因插入位点的估测：根据 T_1 代转基因植株 β-葡萄糖醛酸酶活性的观测结果可以得出一个分离比。根据观测值与单基因孟德尔遗传理论值（表 13.1）的卡方分析结果，可以判定单个基因的插入位点数（表 13.2）。在事例 2 中，T_1 代转基因植株中，83 个单株具有 β-葡萄糖醛酸酶（GUS）活性，而 17 个单株没有（图 13.1），这一结果表明转基因插入位点应该是一个。尽管许多文献上均采用此种分析方法，但值得注意的是，这一方法得出的结果只是对转基因插入位点的一种估测（见注 2）。同

表13.1　1、2、3或4个转基因插入位点的孟德尔遗传模式。例中 T_0 代转基因植株由含有β-葡萄糖醛酸酶报告基因的单个DNA片段或载体转化而来。T_1 代植株中β-葡萄糖醛酸酶基因的有和无分别用G和g表示，表中列出了通过自交或与野生型测交得到的分离群体中阳性和阴性转基因植株分别占群体的理论百分比值

T_0 代转基因植株的基因型[a]	T_1 代转基因植株占群体	
	G/%	g/%
自花授粉		
1 Locus（G）	75	25
2 Loci（G）（G）	93.75	6.25
3 Loci（G）（G）（G）	98.44	1.56
4 Loci（G）（G）（G）（G）	99.61	0.39
野生型测交		
1 Locus（G）	50	50
2 Loci（G）（G）	75	25
3 Loci（G）（G）（G）	87.5	12.5
4 Loci（G）（G）（G）（G）	93.75	6.25

a.（G）（G），T_0 代转基因植株中含有2个β-葡萄糖醛酸酶基因插入位点（G），T_0 代转基因植株中每个位点都为杂合型（外源基因只整合到两条染色体中一条）

表13.2　事例1和事例2分别基于表型和基因型分离的遗传分析。T_1 代转基因植株由 T_0 代自交获得。事例2中100个 T_1 代转基因植株中有7个单株发生了基因沉默，从而导致基于表型的遗传分析结果发生了偏差。而事例1中100个 T_1 代转基因植株中只有2个单株发生了基因沉默，因此并未影响转基因插入位点评估结果的准确性

		T_1 代转基因植株的表型			T_1 代转基因植株的基因型		
		GUS^+	GUS^-	$(\chi^2)^a$	GUS^+	GUS^-	$(\chi^2)^a$
事例1	观察值	71	29		69	31	
1个插入位点	理论值	75	25	ns	75	25	ns
2个插入位点	理论值	93.75	6.25	ns	93.75	6.25	S
3个插入位点	理论值	98.44	1.56	S	98.44	1.56	S
4个插入位点	理论值	99.61	0.39	S	99.61	0.39	S
事例2	观察值	83	17		90	10	
1个插入位点	理论值	75	25	ns	75	25	S
2个插入位点	理论值	93.75	6.25	S	93.75	6.25	ns
3个插入位点	理论值	98.44	1.56	S	98.44	1.56	S
4个插入位点	理论值	99.61	0.39	S	99.61	0.39	S

a. 卡方值（χ^2）为（观察值-理论值）^{2}/理论值总和。例如，事例2中 T_1 代转基因植株中只有1个插入位点时的表型分离结果，具体计算方法是：$[(83-75)^2/75]+[(17-25)^2/25]=3.4$。ns表示观察值与1个位点的理论值相符，没有显著性差异（$P<0.05$）。卡方值超过3.84说明观察值和理论值存在明显差异（S）。另外，卡方值的计算还可以用Yate（自由度为1）修正后获得（|观察值-理论值|-0.5）^{2}/理论值的和值。例如，事例2中 T_1 代转基因植株只有1个插入位点时的表型分离结果为 $[(|83-75|-0.5)^2/75]+[(|17-25|-0.5)^2/25]=3.0$

样是事例2，进一步的分子检测结果（见3.1节中“基于基因型的遗传分析”）却表明，事实上该次外源基因的独立的插入位点应该是2个，而不是1个，因此根据表型得出的结果是不准确的。所以，真正的遗传鉴定应该是基于对转基因后代基因型而并非是表型的调查结果分析所获得的。

3.1.2　基于基因型的遗传分析

表13.1和表13.3分别列出了1个或2个基因插入到1个、2个、3个或4个位点时，自交一代后的子代分离群体中，按照孟德尔遗传规律分离的理论比值。T_1代植株为研究对象，采用的分析方法为PCR检测或者点杂交等分子检测方法。由于采用分子手段对T_1代植株的基因型鉴定比表型鉴定更为昂贵和费工（见3.1节“转基因表型的分离”），因此，基于基因型的遗传分析方法一般很少采用，尽管基于表型的分析方法有种种局限（见注2）。当然，可能的情况下最好将两种方法结合在一起进行分析。下面我们将结合事例2，介绍此种分析方法的具体操作流程：

表13.3　双基因插入位点数分别为1、2、3和4个时自交分离后的孟德尔遗传模式。例中，T_0代转基因植株用2个DNA片段或载体转化，一个含有β-葡萄糖醛酸酶基因，另一个含*LUC*报告基因。T_1代转基因植株中G和g分别代表含与不含β-葡萄糖醛酸酶基因，L和l分别代表含或不含*LUC*基因。下面列出T_1代分离群体中β-葡萄糖醛酸酶基因和*LUC*基因的预期百分比值

T_0代转基因植株的基因型[a]	T_1代转基因植株的基因型			
	G-L/%	g-L/%	G-l/%	g-l/%
1 Locus（G/L）	75	0	0	25
2 Loci（G）（L）	56.25	18.75	18.75	6.25
2 Loci（G）（G/L）	75	0	18.75	6.25
2 Loci（G/L）（L）	75	18.75	0	6.25
2 Loci（G/L）（G/L）	93.75	0	0	6.25
3 Loci（G）（L）（L）	70.31	23.44	4.69	1.56
3 Loci（G）（G）（L）	70.31	4.69	23.44	1.56
3 Loci（G/L）（G/L）（G）	93.75	0	4.69	1.56
3 Loci（G）（G/L）（L）	89.06	4.69	4.69	1.56
3 Loci（G/L）（G/L）（L）	93.75	4.69	0	1.56
3 Loci（G/L）（G）（G）	75	0	23.44	1.56
3 Loci（G/L）（L）（L）	75	23.44	0	1.56
3 Loci（G/L）（G/L）（G/L）	98.44	0	0	1.56
3 Loci（G）（G）（G）	0	0	98.44	1.56
3 Loci（L）（L）（L）	0	98.44	0	1.56
4 Loci（G/L）（G/L）（G）（L）	97.27	1.17	1.17	0.39
4 Loci（G/L）（G/L）（G）（G）	93.75	0	5.86	0.39
4 Loci（G/L）（G/L）（G/L）（L）	98.44	1.17	0	0.39
4 Loci（G/L）（G/L）（G/L）（G）	98.44	0	1.17	0.39

a.（G/L）、（G），T_0代转基因植株含有两个转基因位点：一个位点（G/L）同时含有β-葡萄糖醛酸酶基因和*LUC*基因，另一个位点（G）只含有β-葡萄糖醛酸酶基因。T_0代转基因植株每个位点都为杂合型（外源基因只整合到两条染色体中的一条）

（1）转基因植株的培育和表型鉴定分离结果的统计按照 3.1 节中转基因表型的分离中步骤 2~5 进行。保证结果准确性的重要一步是，T_1 代植株不要选择以使所有植株存活，并可以用于后续的实验分析。因为抗生素或除草剂的筛选会杀死转基因沉默的个体，从而导致遗传分析的结果发生偏差（见注 2）。在事例 2 中，具有明显 β-葡萄糖醛酸酶活性的 83 粒 T_1 代种子（图 13.1）应该是含有 β-葡萄糖醛酸酶基因的，因此无需进行进一步的分析。而 17 个不具有 β-葡萄糖醛酸酶活性的 T_1 代植株则应该利用分子检测手段作进一步的鉴定，以明确它们是因为 β-葡萄糖醛酸酶基因的沉默，还是确实不含有 β-葡萄糖醛酸酶基因而没有表现出 β-葡萄糖醛酸酶活性。

（2）收集 17 个不具有 β-葡萄糖醛酸酶活性的 T_1 代植株的叶片样品，以及阴性对照（野生型植株）和经 PCR 检测的阳性对照样品，样品的长度应该与 1.5 ml 的微型离心管匹配。

（3）按照产品的使用说明用 DNA 提取试剂盒抽取叶片样品的基因组 DNA。

（4）PCR 反应中应加入的 DNA 模板量根据各物种的基因组大小而定，25 μl PCR 反应体系中水稻基因组 DNA 的加入量通常为 25 ng，而大麦或者小麦则为 100~150 ng。

（5）每个 PCR 反应体系包括植物基因组 DNA，1×的反应缓冲液（含 2.5 mmol/L $MgCl_2$），250 μmol/L dNTP，正、反引物各 0.4 μmol/L（如根据 β-葡萄糖醛酸酶基因设计），2 U *Taq* DNA 聚合酶。

（6）PCR 的反应程序：DNA 样品先 95℃变性 1 min；接着是 95℃变性 30 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 1 min，共 30 个循环；循环结束后，72℃最后延伸 10 min。

（7）PCR 反应产物（5~10 μl）用 1%~1.2%（*m/V*）含有溴化乙锭的琼脂糖凝胶进行电泳分析（每 100 ml 凝胶加入 5 μl 溴化乙锭，琼脂糖凝胶用 0.5×TBE 缓冲液加热溶解），电泳时电压为 80~100 V，时间约为 20 min。紫外灯下观察（图 13.2）到 17 个 T_1 代检测样品中有 7 个单株含有 β-葡萄糖醛酸酶基因却没有 β-葡萄糖醛酸酶活性（即 β-葡萄糖醛酸酶基因被沉默了）。

（8）可以利用植物本体单拷贝看家基因或者 RFLP 探针的引物重复步骤 5~7 对 DNA 样品进行质量鉴定，以确保它们能够成功地进行 PCR 扩增。通过对看家基因的扩增分析，结果表明从事例 2 中获得的 10 个样品可以进行 PCR 扩增（图 13.2）。

（9）计算转基因插入位点数：利用孟德尔遗传规律的理论值（表 13.1）可以对所获得的观察值进行卡方检测。事例 2 中，90 个 T_1 代单株含有 β-葡萄糖醛酸酶基因，而 10 个单株不含，根据卡方检测结果我们可以看出植物基因组中转基因的插入位点应该是两个，它们可以独立地自由分离（表 13.2）。

3.1.3　跨世代 Southern 分析

Southern 分析一般用于鉴定各个转基因插入位点的排列形式（见 3.2 节中“Southern 分析”）。当然，通过对不同世代转基因植株杂交检测结果的比较，它也可以用于转基因插入位点数的测定。例如，根据 T_0 代和自交所得到 T_1 代植株的 Southern 分析结果就可以判定外源基因的插入位点数。以事例 2 为例，下面具体介绍这种方法。

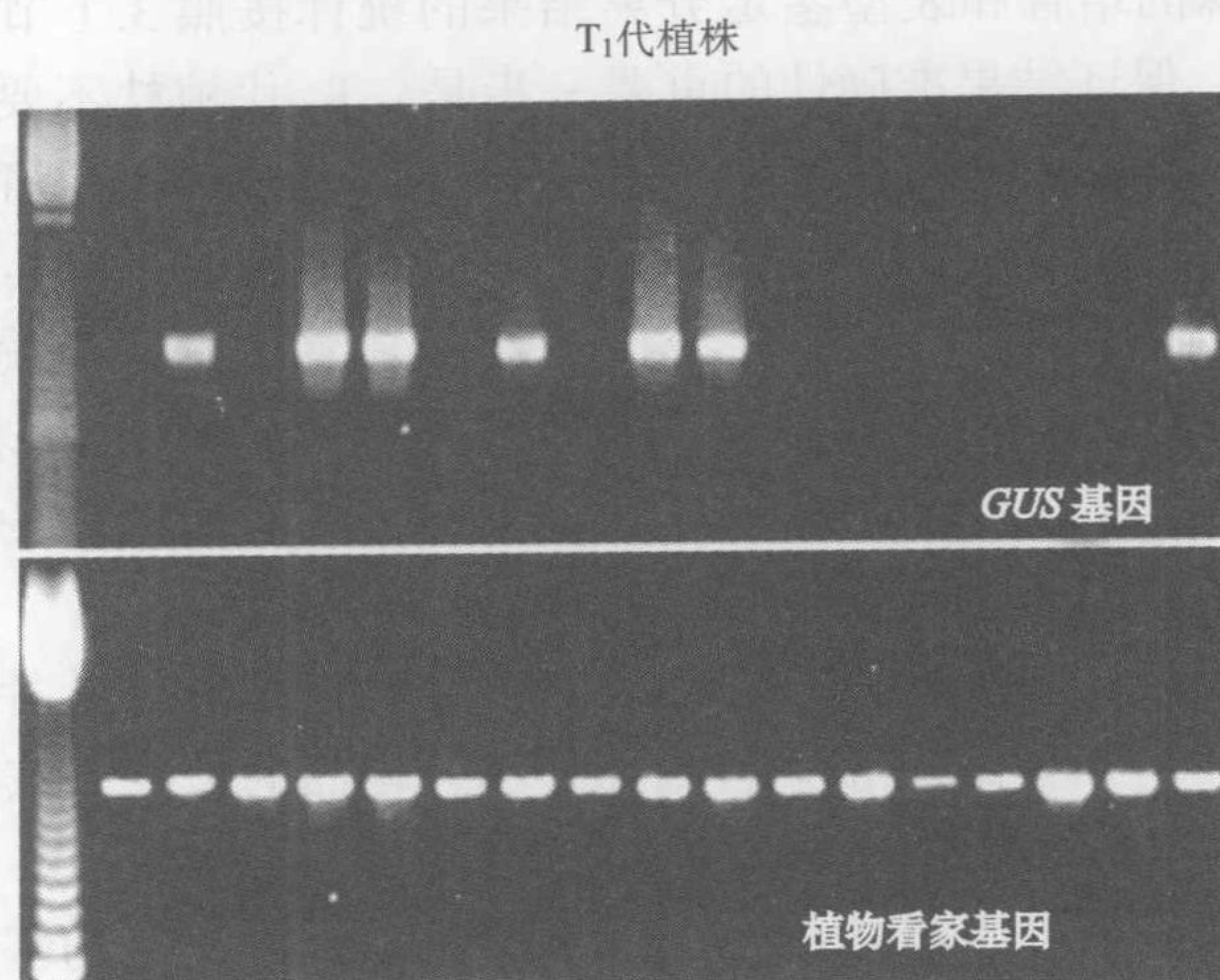


图 13.2　无外源基因表达活性植株的 PCR 鉴定。例中为事例 2：结果表明 17 个无 β-葡萄糖醛酸酶活性（图 13.1）的 T_1 代植株中有 7 个单株发生了 β-葡萄糖醛酸酶基因沉默

（1）样品的 DNA 可以按照 DNA 提取试剂盒推荐的方法从植株叶片中抽提（见注 3），DNA 的浓度根据所提样品在波长为 260 nm 的吸光值推算。样品提好后可以放在 4℃短时保存，也可以长期存储在−20℃中（见注 4）。

（2）用于 Southern 分析的 DNA 量主要根据每个作物基因组的大小而定，一般水稻为 5 μg，大麦和小麦则需要 20 μg。DNA 样品消化时，反应体积为 50~80 μl，限制性内切核酸酶的用量为 10~15 U/μg DNA（见注 5）。另外，进行样品 DNA 消化时应同时消化阴性对照（即野生型）和阳性对照（如已经过 Southern 分析鉴定为阳性的单株）的 DNA。

（3）酶切消化后的反应液先用真空离心机浓缩到约 30 μl 的体积，然后加入到浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶中（用 1×的 TBE 熔化），在 40 V 的电压下电泳过夜。同时凝胶中还应该加入 1 或 2 种标记（如 600 ng 的用 *Pst* Ⅰ或者 *Hind* Ⅲ酶切后的 λ 噬菌体 DNA 产物）。另外，在空白点样孔上还应加入限制酶的反应缓冲液以避免电泳时有可能发生的带偏差。

（4）电泳完毕后，用溴化乙锭染好的凝胶在紫外灯下拍下照片，以便于确定 DNA 的酶切消化程度和各个样品点样时的均一度，同时记录标记的各个条带在凝胶中的位置。

（5）凝胶先用 0.25 mol/L HCl 溶液（缓慢摇动）洗 15 min 后再用水冲洗，然后在 0.4 mol/L NaOH 溶液中变性 15 min 后，将 DNA 样品过夜印迹到尼龙膜上。转印完成后，将尼龙膜放入 2×SSC 溶液中洗 2 min，再用薄膜包好放在 5℃下短期保存或者−20℃下长期保存。

（6）尼龙膜在 65℃下先放入杂交液中预杂交 2~5 h，杂交时要保持缓慢的摇动。

50 ml 杂交液中含有 2 ml 5×HSB、1 ml Denhardt 反应液Ⅲ和 1 ml 载体 DNA（在沸水中变性 7 min）。

（7）杂交使用的探针（长度大约为 500 bp）可以通过对转化用质粒进行酶切凝胶回收（用 QIAquick Gel Extraction kit 试剂盒）后获得，也可以通过 PCR 扩增后再用 PCR 回收试剂盒（即 QIAquick PCR Purification kit）回收后获得，具体操作根据产品的使用说明。25 ng（体积 15 μl）的探针沸水浴 7 min 后在冰上放置 5 min，然后加入 5 μl OLB、2 μl BSA、2 μl DNA Polymerase I Klenow 片段（5 U/μl）和 2 μl ^{32}P dCTP 在 37℃下反应 2 h 以完成探针的标记。标记好的探针用 2. 6 μl 3 mol/L NaOH 变性 5 min，然后加入到预杂交液中。杂交膜在预杂交液中 65℃缓慢振荡过夜。

（8）尼龙膜先用 500 ml 2×SSC 和 1% SDS 溶液洗两次，每次 15 min，然后再用 500 ml 0. 2×SSC 和 1% SDS 溶液洗两次，每次也是 15min。洗好后，尼龙膜用薄膜包好。

（9）估测转基因插入的位点数：处理好的尼龙膜可以用胶片放射自显影分析或者磷屏分析。例如，在事例 2 中通过比较 T_0 和 T_1 代植株的 Southern 分析结果可以得出转基因插入位点为两个（图 13. 3）。尽管 Southern 分析方法可以精确地鉴定出转基因插入位点的数目，但是也有其局限性，具体请见注 6。此外，这种分析方法也可以用来检测后代中转基因位点结构的稳定性。当多个 DNA 片段或者载体一起转化时，Southern 分析也应该用可以公用的单个探针或者多个特异性的探针混合在一起进行杂交（即每个片段或载体一个探针）。

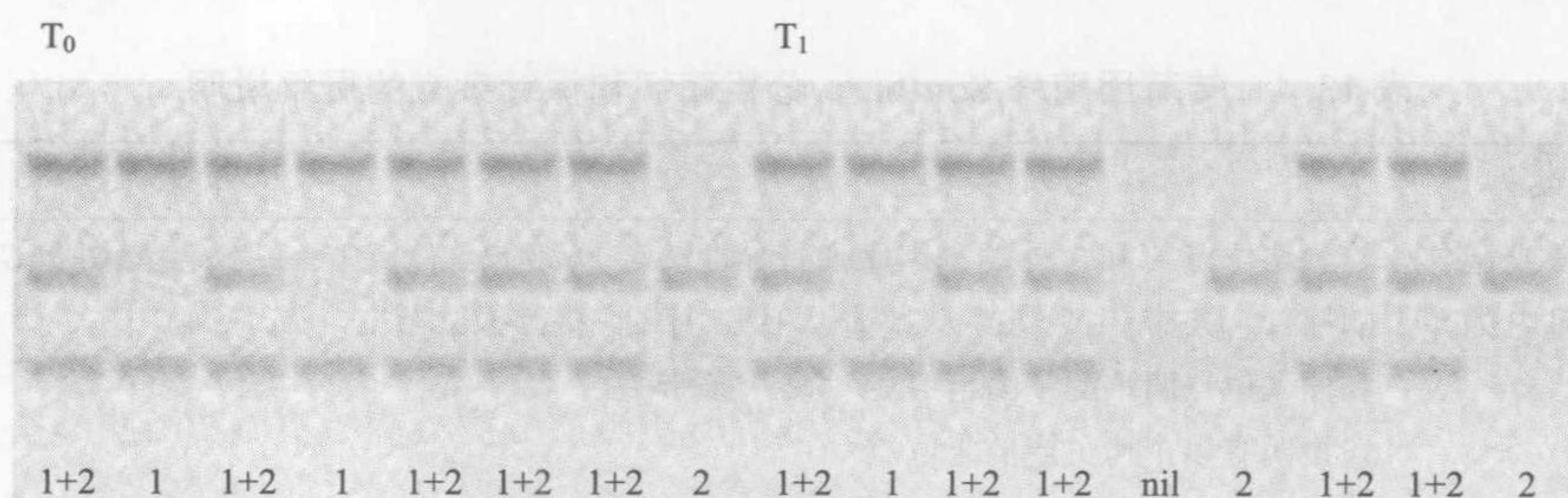


图 13. 3 T_0 代和自交获得的 T_1 代转基因植株的 Southern 分析。图中为事例 2（*Xba* I 酶切，β-葡萄糖醛酸酶基因探针杂交）。1、2 和 1+2 指的是 T_1 代含有位点 1、2 或位点 1+位点 2 的转基因植株杂交带型。Nil 指的是阴性植株

3. 2 每个转基因插入位点的构型

当只有一个外源基因插入位点时，通过对 T_0 代植株的分子鉴定即可以了解插入位点外源基因的拷贝数和排列方式。当发现转基因植株中有多个插入位点时（根据 3. 1 节中的方法鉴定），则要对每个插入位点逐个进行分析，其主要是采用分析分离群体的单株，或者分析各个位点的纯合系的方法。

3. 2. 1 Southern 分析

在鉴定转基因插入位点的构型时，Southern 分析是最常用的方法。通过酶切和能覆

盖用于转化的全长 DNA 序列（包括载体的骨架序列）的探针的联合分析，可以重构出每个插入位点的全部结构。首先要做的是估测每个插入位点的外源基因拷贝数（保持原样或者重排）。根据插入位点的复杂性采用不同的方法进行分析。下面分别介绍含有一个或少数几个的拷贝数的简单转基因插入位点，以及含有大量拷贝数的复杂转基因插入位点的具体分析方法。

（1）DNA 的提取、膜的制备和杂交具体可以参考 3.1 节步骤 1~8。植物基因组 DNA 一般采用单酶切，本例中用的是质粒中的 *Xba* Ⅰ 酶切位点。使用的探针必须可以与酶切位点 5′（以潮霉素基因为例）或者 3′（以 β-葡萄糖醛酸酶基因为例）端的外源基因序列特异性杂交（见注 8）。

（2）用放射自显影仪或者感光成像仪对膜进行初步分析，根据所得的结果一般就可以对每个插入位点的复杂性进行初步的评估。

i）简单插入位点的分析

经过酶切和探针杂交后，Southern 分析所得结果产生最多 4 条亮度相近的杂交条带（如事例 2 位点 1 和位点 2）。

（a）用于 Southern 分析（3.1 节步骤 1~8）的限制性内切核酸酶（见注 9）和探针可以参照表 13.4 的常用方法。通过 Southern 分析不仅可以对转基因位点区域内的序列进行研究，也可以对两边近邻序列进行分析。如果需要更为精确的结果，推荐最好还是用多种不同的酶和探针进行多次分析。例如，在事例 2 的位点 1 中（图 13.4），应该再

表 13.4　转基因植株 Southern 分析酶切和探针杂交的提纲说明

限制酶类型	探针类型	事例
在转化片段或载体的表达区间内的单次酶切	与酶切位点 5′和 3′外源基因序列特异性结合的探针，条带一般包括外源基因 DNA 序列和插入位点两端的基因组 DNA。多个条带一般说明有多个拷贝或插入位点	事例 2：位点 1——*Xab* Ⅰ 酶切和 *GUS* 或 *HPT* 基因探针杂交（图 13.4）
酶切位点位于启动子，基因区：终止子表达区两端	探针与各个外源基因序列特异性结构，如果有多条杂交带，用启动子和终止子的探针进行进一步的分析	事例 2：位点 1——*Hind* Ⅲ 酶切，用 *GUS* 基因探针杂交（图 13.4）后再用 *GUS* 基因启动子和终止子的探针分析
酶切位点位于所有表达区两端	探针与各个外源基因序列特异性结合，杂交条带的大小可以说明插入序列的完整性	事例 2：位点 2——*Pme* Ⅰ 酶切，*GUS* 或 *HPT* 基因探针杂交（图 13.5）
酶切不在转化片段或载体上	探针与各个外源基因序列特异性结构，当用多种酶（5 种以上）酶切，均只得到一条带时说明只有一个转基因插入位点，且其中无大片段的植物基因组 DNA 夹杂	事例 1：*Pac* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ、*BstX* Ⅰ、*Apa* Ⅰ 或 *Kpn* Ⅰ 酶切，*GUS* 基因探针杂交
酶切位点位于转化片段上	载体本身序列特异性结合的探针，最好用载体中进行细菌（大肠杆菌或农杆菌）选择的抗性（antibiotic resistance）基因的探针	事例 1：*Xba* Ⅰ 或 *Hind* Ⅲ 酶切，*NPI* 基因探针杂交

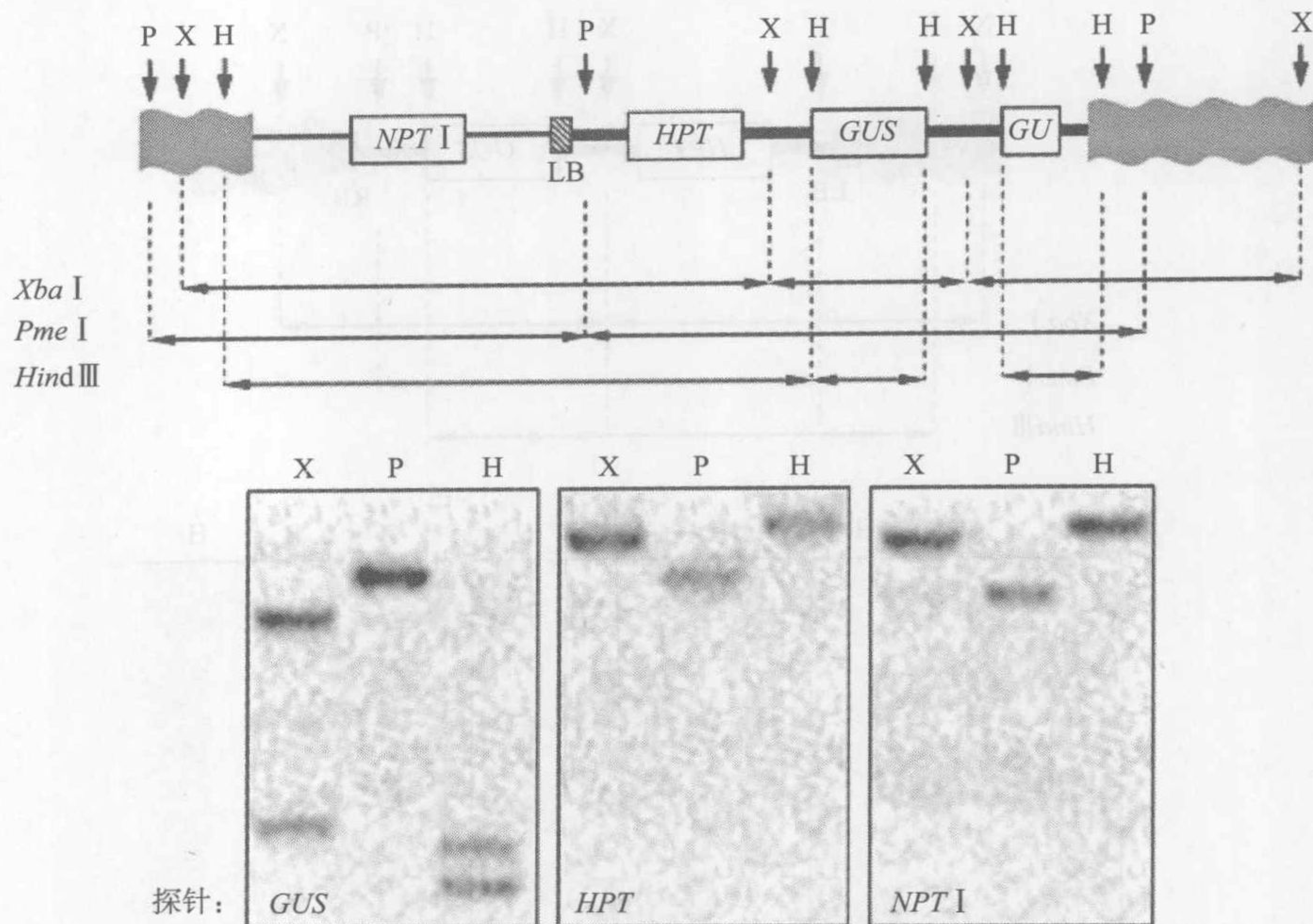


图 13.4　事例 2——位点 1 的 Southern 分析。DNA 来自于 T_2 代纯合植株，用 *Xba* Ⅰ（X）、*Pme* Ⅰ（P）或 *Hin*dⅢ（H）酶切。膜用 β-葡萄糖醛酸酶基因、潮霉素基因或 *NPT* Ⅰ（载体上卡纳抗性基因）基因探针杂交

用 *Hin*dⅢ作为限制性内切核酸酶酶切，该酶切位点位于 β-葡萄糖醛酸酶基因表达区的侧边，用 β-葡萄糖醛酸酶基因启动子或终止子的序列作为探针进行杂交分析，因为在该插入位点上可能存在多拷贝和重排的外源基因。另外，利用与载体抗性基因序列特异性结合的探针还可以检测转基因个体中是否含有载体序列。

（b）事例 2 位点 1 的结构鉴定：经过 *Xba* Ⅰ和 *Hin*dⅢ酶切及 β-葡萄糖醛酸酶基因探针杂交后，膜上出现的多个条带说明该插入位点可能含有多拷贝的 β-葡萄糖醛酸酶基因，一个完整和一个可能缺失的。但是，潮霉素基因和 *NPT* Ⅰ基因探针的杂交条带却只有一条，这个结果表明载体序列已经转染和整合到了植物基因组上。这主要是因为 T-DNA 的左边界的无效识别/剪切，导致对 T-DNA 序列的“通读”引起的（见注 10）。根据杂交条带的大小，则可以推测出插入位点序列形成的结构（图 13.4）。

（c）事例 2 位点 2 的结构鉴定：用 β-葡萄糖醛酸酶基因和潮霉素基因的探针进行杂交时只有一条带。用 *NPT* Ⅰ的探针杂交时没有信号，表明载体主骨架没有整合到植物基因组上。根据杂交条带的大小可以推测出该位点序列所形成的结构（图 13.5）。

ii）复杂插入位点的分析

通过多种不同的限制性内切核酸酶和探针对事例 1 进行 Southern 分析，发现杂交结果中有 4 条或以上信号强度不同的杂交带（图 13.6）。对于这种情况，杂交结果一般不太可靠［17］，单独的结果也不能用来精确地推测插入位点的构型和外源基因的拷贝数（见注 11）。但是通过对杂交信号的光密度分析，还是可以估测转基因以及外源基因完

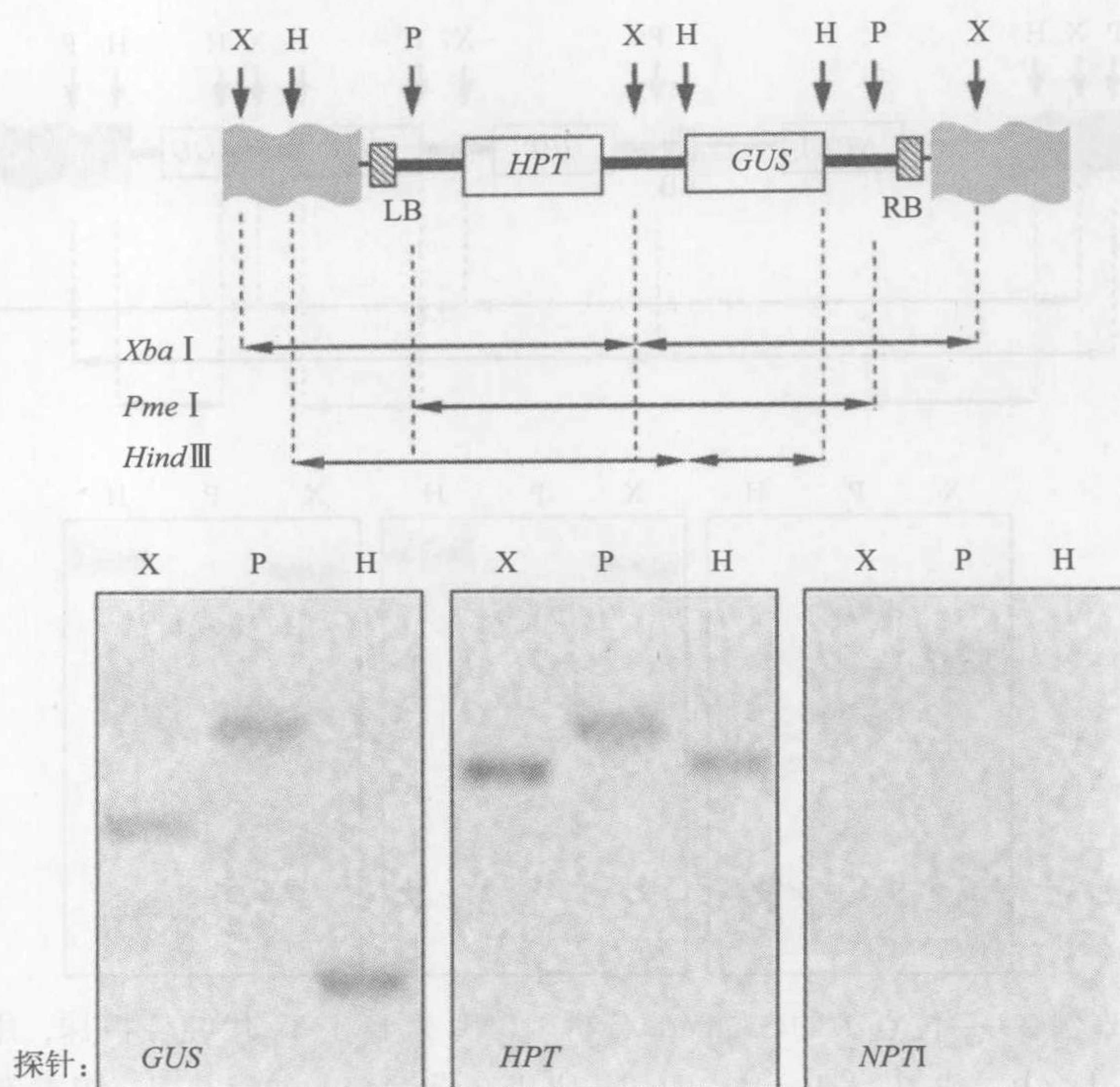


图 13.5　事例 2——位点 2 的 Southern 分析。DNA 来自于 T_2 代纯合植株，用 *Xba* Ⅰ（X）、*Pme* Ⅰ（P）或 *Hind* Ⅲ（H）酶切。膜用 β-葡萄糖醛酸酶基因，潮霉素基因或 *NPT* Ⅰ（载体上卡那抗性基因）基因探针杂交

整的表达单位（即启动子+基因+终止子）的拷贝数。用转基因载体上所没有的酶切位点进行 Southern 分析时，通过所得的结果也可以帮助了解插入位点处植物基因组序列的存在情况。

（a）DNA 的提取可以参考 3.1 节步骤 1。必须先精确测定野生型植物基因组 DNA 浓度和作为标样的质粒 DNA 浓度，以便于后续的光密度分析（见注 12）。

（b）DNA 的消化可以参考 3.1 步骤 2。与 1、2、5、10、20、40 和 80 拷贝外源基因相当的标样分别加入 5 μg 野生型 DNA 中（见注 13），另外推荐在每张膜上加入阳性对照（见注 14）。

（c）Southern 分析主要参考 3.1 节步骤 3~8，利用 β-葡萄糖醛酸酶基因表达区相邻的 *Hind* Ⅲ酶切位点，或者是 *Pac* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ、*Bst*X Ⅰ、*Apa* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ等转化载体上无酶切位点的酶，降解植物基因组 DNA。分析时需要 4 种不同的探针：1 个单拷贝的 RFLP 探针；3 个分别可以与 β-葡萄糖醛酸酶基因、潮霉素基因和 *NPTI* 基因特异性结合的探针。RFLP 探针是为了保证各个样品所加样量的均一性（见注 14）。经过 *Hind* Ⅲ酶切后的杂交，一些条带的大小和质粒 DNA 酶切产生的（*GUS*）的表达区（2.9 kb）相似，而其他的更大或小一些的条带可能是由 DNA 重排所致。利用 *Spe* Ⅰ和 *HPT* 基因探针的

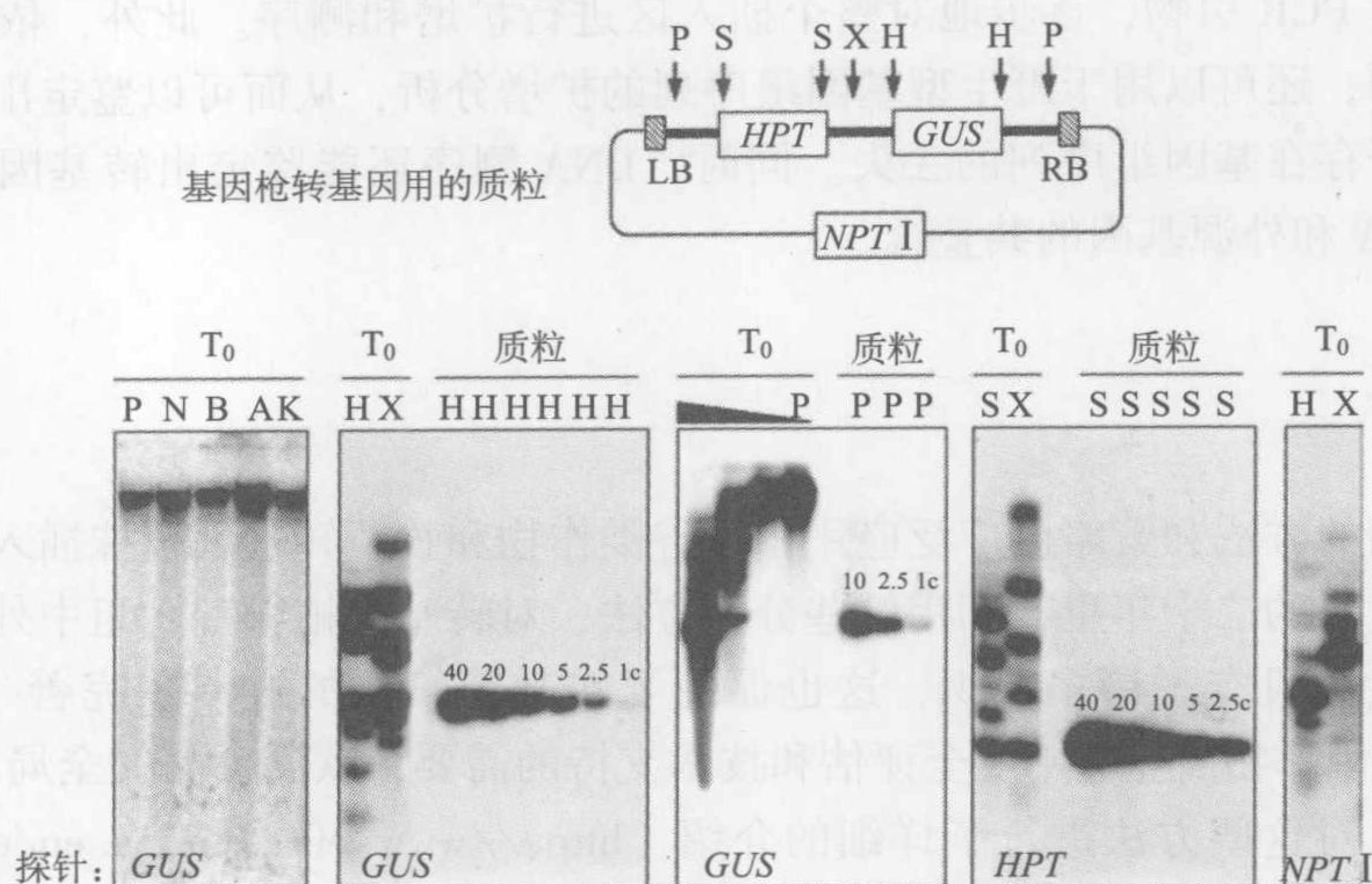


图 13.6　事例 1 的 Southern 分析。DNA 来自于 T_0 代植株或用于粒子轰击的质粒，分别用质粒中无酶切位点的酶［*Pac* Ⅰ（P）、*Nhe* Ⅰ（N）、*Bst*X Ⅰ（B）、*Apa* Ⅰ（A）、*Kpn* Ⅰ（K）］或可以酶切质粒的酶［*Xba* Ⅰ（X）、*Hind* Ⅲ（H）、*Spe* Ⅰ（S）］酶切。黑色三角形标明的是用于酶切植物基因组 DNA 的 *Pme*I 的浓度梯度。标样代表的 β-葡萄糖醛酸酶基因或潮霉素基因拷贝数已标明，杂交膜用 β-葡萄糖醛酸酶基因、潮霉素基因或 *NPTI*（载体上卡纳抗性基因）基因探针杂交

Southern 分析的结果与上面类似（图 13.6）。而利用载体无酶切位点的 *Apa* Ⅰ进行酶切时，β-葡萄糖醛酸酶基因探针杂交出了两条带，由此表明该插入位点内可能还含有部分植物基因组序列。事例 1 中存在着大量拷贝的 *NPT* Ⅰ基因，也证实了载体序列的整入(因为基因枪法使用的是完整的载体质粒)。然而根据这些信息仍然无法得出事例 1 中转基因插入位点的构型。

（d）事例 1 中转基因拷贝数的鉴定：杂交膜上除去背景后所有杂交信号的强度都可以用光密度计（Bio-Rad 690）或感光成像仪等仪器进行定量分析。根据信号的强度和基因拷贝数的相关性，通过回归分析可以重建标准曲线。依照标准曲线和酶-探针联合分析的结果，则可以推测出每个样品外源基因的拷贝数（见注 15）。*Hind* Ⅲ、*Spe* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切后杂交的信号表明转基因事例 1 中含有 36 个拷贝的 β-葡萄糖醛酸酶基因和 14 个拷贝的潮霉素基因（图 13.6）。

3.2.2　其他方法

通过 Southern 杂交分析，对每个转基因插入位点的总体结构有了一个大致的了解。但是要想完全掌握转基因插入位点的所有信息，则需要对插入区和近邻的基因组序列进行测序分析［18，19］，有时对基因组 DNA 的序列分析更为重要。本章中，对此方法不做详细介绍，但是，拟南芥（*A. thaliana*）［20，21］和水稻［22］等模式植物的转基因近邻序列高通量分析方法已见诸报道。根据插入区近邻植物基因组序列的测序结

果，可以设计 PCR 引物，逐步地对整个插入区进行扩增和测序。此外，依照近邻序列所设计的引物，还可以用于野生型基因组序列的扩增分析，从而可以鉴定出外源基因插入位点处是否存在基因组序列的丢失。同时，DNA 测序还能鉴定出转基因时是否发生了叶绿体 DNA 和外源基因的共整合。

3.3 小结

本章介绍的方法和策略已广泛应用于禾谷类作物和牧草转基因植株插入方式及位点的分析。在过去的二十年里，利用这些分析方法，对转基因植物基因组中外源基因的插入方式和位点数目有了诸多认识，这也促使了转基因策略的进一步完善［1］。此外，因为欧盟转基因作物商业应用安全评估和技术支持的需要，欧洲食品安全局（EFSA）的执行指南里也对这些方法进行了详细的介绍（http://www. efsa. europa. eu/etc/medialib/efsa/science/gmo/gmo _ guid ance/gmo _ guidance _ ej374. Par. 0001. File. tmp/gmo _ guidance_ ej374_ gmm. pdf）。

4. 注释

注 1：由于禾谷类作物本身天然具有很高的抗性水平，因此对完整种子（如放在含有抗生素的润湿的滤纸或者琼脂培养基上进行萌发）或植株（如用抗生素溶液涂叶片）做抗生素抗性筛选常常无效。如果抗性筛选必不可少，成熟的胚应从灭菌后的种子上切下，然后胚轴朝下放在含有与筛选 T_0 代植物相同抗生素浓度的固体培养基上培养。

注 2：基因沉默会导致将无转基因表达的后代误判为阴性个体，这将会使阴性个体的观察值偏高，从而会低估转基因插入位点的个数（见表 13.2 中的事例 2）。当 T_0 代转基因植株含有多个转基因插入位点时，外源基因的沉默发生频率会更高。当只用一种载体进行水稻转化时，基于外源基因表达活性进行插入位点数的评估时，错误率为 36%［23］。当用多种载体或 DNA 片段进行共转化时（如用基因枪转多个片段），后代植株中每一个目标基因的活性都必须进行鉴定。例如，如果转化时一个 T-DNA 含有 β-葡萄糖醛酸酶基因，另一个 T-DNA 含有 *LUC* 基因，则在对 T_1 代植株的分离情况进行调查时，两个基因的活性都必须进行测定。然后将观察值与双基因孟德尔遗传理论值（表 13.3）进行比较和卡方分析。水稻中，当同时用两种 T-DNA 进行共转化时，依据外源基因的表达活性对外源基因插入位点数进行评估，错误率为 78%［15］。因此如果需要对转基因植株中插入位点进行精确鉴定，基于表型分离的遗传分析结果只能是分子分析方法的一种补充。

注 3：在进行成熟植株 DNA 的提取时，幼嫩叶片一般比较好。对于水稻等某些特定农作物的 DNA，为了尽量减少多糖和酚类复合物的存在，植株可以先在黑暗的环境下放置 1~2 天，这样可以提高抽提的植物 DNA 的质量和数量。

注 4：尽量避免存储于微型管里的 DNA 溶液进行反复的冻融和离心，因为这样经常会造成 DNA 的断裂。

注 5：为了保证酶切消化反应液的体积，可以用 PCR 仪进行消化，因为 PCR 仪的热盖可以防止反应液在微型离心管盖上的凝结。

注 6：当外源基因插入位点数和拷贝数非常多，或者物种本身的自交难度较大时，如一些草本植物存在自交不亲和，进行 T_0 代和后代植株之间的 Southern 杂交结果的比较分析就比较困难。转基因后代植株的数量，至少要保证对每个独立插入位点都实行鉴定。根据已有的经验，要实现对 2 个、3 个和 4 个插入位点的 Southern 杂交鉴定，至少分别要保证有 8 个、20 个和 30 个自交后代。而当转基因植株含有 3 或 4 个插入位点时，至少要有 32 个和 128 个后代植株，才有机会完成对每个插入位点的单独分析。实践中，当转基因植株含有 2 个以上的插入位点时，相对于 Southern 杂交分析，最好还是采用 3.1 节中详细介绍的基于基因型进行的遗传分析方法。

注 7：当对外源基因的插入位点数一无所知时，T_0 代植株的 Southern 分析就要比较谨慎了，因为复杂的杂交带型并不代表单个位点中含有多重拷贝，而有可能是由多个插入位点所引起的。通过农杆菌介导获得的转基因植株一般都有多个插入位点。前人对于水稻的研究表明，一半以上的转基因植株均含有多个 T-DNA 插入位点［23］。

注 8：进行重杂交之前，应该先在标准条件下曝光，以确定膜的背景信号（如用与探针杂交后一致的曝光时间）。人为造成的背景差异会影响转基因拷贝数和插入位点鉴定结果的精确性。多拷贝数（20 或以上）基因杂交信号的衰减时间会很长。将膜放在煮沸的 500 ml 0.1×SC 和 0.5% SDS 中洗脱三次，每次 5 min，以去除残留的杂交信号。

注 9：如果条件允许，在 Southern 分析时最好避免使用对 CpG 和 CpNpG 甲基化敏感或者有星号活性的限制酶，这样可以尽量减少由于酶切而造成的对转基因插入位点复杂性的误判。

注 10：根据载体 T-DNA 边界外序列设计的探针进行的 Southern 分析，可以用来检测小片段骨架序列整合至植物基因组的概率。

注 11：DNA 的纯度低、限制酶用量的不够或者酶切消化体积的偏小，都有可能会导致 Southern 杂交带型发生改变。例如，限制性内切核酸酶用量的减少会导致完整的 HPT-GUS 条带的信号减弱，而相应的大分子质量的条带信号增强（图 13.6）。这一结果表明，在 Southern 分析中出现的较为复杂的高分子质量的杂交条带，也可能是因为限制性内切核酸酶酶量不足导致的一种假象。因此，在鉴定这些杂交条带时需格外小心谨慎，尤其是把这些杂交条带的信号强度作为鉴别标准时，要考虑是否有人为因素影响。

注 12：应该进行多次，如三次以上，测定用于作为标样的植物基因组和质粒 DNA 的浓度。由于 DNA 浓度测定的偏差，有可能会影响后续转基因拷贝数的测定结果的准确性。要引起重视的是，通过分光光度计测定的 DNA 标样浓度，往往要比用凝胶分析和溴化乙锭染色后，再与高精准商业 DNA（如 λ 噬菌体 DNA）进行比较所获得的 DNA 标样浓度的准确性要差。所有的 DNA 样品浓度应该采用相同的测定方法，如果可能的话最好同批次测定。

注 13：通过梯度稀释获得与每个基因组含有 1~40 个拷贝的转基因相当的质粒 DNA，并将这些质粒 DNA 分别加到一定量的野生型植物基因组 DNA 中，用于制备标样。当质粒 DNA 浓度较低时，应该采用 1/10 TE 进行稀释，从而可以减少质粒 DNA 的

降解。每个野生型基因组中加入2分子的质粒来代表转基因中单拷贝的纯合型，如事例2中的T_2代转基因植株。在分析T_0代转基因植株时，由于插入位点处为杂合型，每个基因组中只加入1分子的质粒。以水稻为例，63 pg的质粒（5792 bp）在5 μg T_2代水稻基因组DNA中相当于1个基因组中有1个拷贝的外源插入（5792 bp×660 Da/bp×1.65×10^{-24} g/Da＝6.3×10^{-18} g/plasmid，5 μg水稻DNA/0.5 pg每个水稻基因组＝10^7基因组，6.3×10^{-18}×10^7 g＝63 pg质粒对于每个2 C水稻基因组）。代表高拷贝数的外源基因插入的标样会产生的强杂交信号，信号衰减的时间比较长，甚至用化学法洗膜后信号还存在（见标注8）。制备标样DNA时，可以在野生型DNA中加入多个不同的转基因质粒，但需保证这些质粒酶切后的产物长度不同，且其长度差异足够防止后期杂交信号的相互干扰。

注14：大量提取已经鉴定过的1个（最好为2个）转基因系（作为阳性对照）和野生型（作为阴性对照和可以和质粒DNA混合建立标样）的DNA是很有用的。提好后，分装成一次酶切的所需量，并保存于-20℃环境下。这样也能保证后续试验中，相同来源的DNA用量保持一致，保证最终结果可用光密度计来量化。当用基因组RFLP探针进行杂交时，阳性对照和阴性对照所得到的信号可以用来标准化转基因植株DNA的上用量。当用转基因序列探针进行杂交时，膜间阳性对照信号的差异可以用来评估所测得的转基因拷贝数的误差。

注15：在同一张膜上每个转基因植株推荐进行两次分析（如用两种不同的酶消化），以保证两次实验所得到的转基因拷贝数结果可以相互验证。

（张　华　朱　英　译）

参考文献

1. Vain, P. (2007) Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnol. J.* 5, 221-229.
2. Zambryski, P., Joos, H, Genetello, C, Lee-mans, J, Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
3. Hiei, Y., Ohta, S, Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282.
4. Paszkowski, J, Shillito, R. D, Saul, M, Mandak, V., Hohn, T., Hohn, B. and Potrykus, I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3, 2717-2722.
5. Shimamoto, K, Terada, R, Izawa, T. and Fujimoto, H. (1989) Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338, 274-276.
6. Gordonkamm, W. J, Spencer, T. M, Mangano, M. L, Adams, T. R, Daines, R. J., Start, W. G, Obrien, J. V, Chambers, S. A, Adams, W. R, Willetts, N. G, Rice, T. B, Mackey, C. J, Krueger, R. W, Kausch, A. P. and Lemaux, P. G. (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2, 603-618.
7. McCabe, D. E, Swain, W. F., Martinell, B. J. and Christou, P. (1988) Stable transformation of soybean

(*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio-Technology* 6, 923-926.

8. Vain, P. (2006) Global trends in plant transgenic science and technology (1973-2003). *Trends Biotechnol.* 24, 206-211.
9. Kohli, A, Leech, M, Vain, P., Laurie, D. A. and Christou, P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *P. N. A. S. USA* 95, 7203-7208.
10. Martineau, B, Voelker, T. A. and Sanders, R. A. (1994) On defining T-DNA. *Plant Cell* 6, 1032-1033.
11. Rommens, C. M, Humara, J. M, Ye, J. S, Yan, H, Richael, C, Zhang, L, Perry, R. and Swords, K. (2004) Crop improvement through modification of the plant' s own genome. *Plant Physiol.* 135, 421-431.
12. Vain, P., Worland, B, Kohli, A, Snape, J. W., Christou, P., Allen, G. C. and Thompson, W. F. (1999) Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *Plant J.* 18, 233-242.
13. Svitashev, S. K. and Somers, D. A. (2001) Genomic interspersions determine the size and complexity of transgene loci in transgenic plants produced by microprojectile bombardment. *Genome* 44, 691-697.
14. Cluster, P. D, Odell, M, Metzlaff, M. and Flavell, R. B. (1996) Details of T-DNA structural organization from a transgenic Petunia population exhibiting co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 32, 1197-1203.
15. Afolabi, A. S, Worland, B, Snape, J. W. and Vain, P. (2004) A large-scale study of rice plants transformed with different T-DNAs provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theor. Appl. Genet.* 109, 815-826.
16. Lu, H. J, Zhou, X. R, Gong, Z. X. and Upadhyaya, N. M. (2001) Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 241-248.
17. Vain, P., James, V. A., Worland, B. and Snape, J. W. (2002) Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 105, 878-889.
18. Svitashev, S. K, Pawlowski, W. P., Makarevitch, I., Plank, D. W. and Somers, D. A. (2002) Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *Plant J.* 32, 433-445.
19. Son, D. Y, Ahn, K. M. and Lee, S. I. (2003) Sequencing, cloning and expression of CP4EPSPS roundup ready soybean insert. *Food Sci. Biotechnol.* 12, 133-136.
20. Spertini, D, Beliveau, C. and Bellemare, G. (1999) Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA. *Biotechniques* 27, 308-314.
21. Strizhov, N, Li, Y., Rosso, M. G, Viehoever, P., Dekker, K. A. and Weisshaar, B. (2003) High-throughput generation of sequence indexes from T-DNA mutagenized Arabidopsis thaliana lines. *Biotechniques* 35, 1164-1168.
22. Sallaud, C, Meynard, D, Boxtel, J. V, Gay, C, Bes, M, Brizard, J. P, Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M, Portefaix, M, Ouwerkerk, P. B. F., Rueb, S, Delseny, M. and Guiderdoni, E. (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1396-1408.
23. Vain, P., Afolabi, A. S, Worland, B. and Snape, J. W. (2003) Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/ pSoup. *Theor. Appl. Genet.* 107, 210-217.

第14章　荧光原位杂交技术检测植物基因组中整合的转基因片段

Trude Schwarzacher

摘　要： 在过去30年中，荧光染色体分析技术促进了人们对基因组构造的了解，并加深了对DNA的组织结构及染色体进化的认知。通过荧光染色，即使小型染色体也可以检出，并且可以获知其组分、形态结构及进行染色体计数，可以确认物种、选系和单株的染色体非整倍性及多倍性，包括杂交或组培及遗传转化导致的染色体变异。荧光原位杂交（FISH）将DNA序列的分子信息与其在染色体及基因组上的物理位置相联系，因而此技术能确定序列的物理位置，对于那些用其他分子方法很难定位的片段，或者需要通过遗传分离分析的片段（尤其是多拷贝或重复DNA片段），FISH常常是唯一的方法。同时，FISH技术常常也是确定转基因片段整合与否、片段的拷贝数，以及片段在染色体上的物理结构的最好方法。本章介绍了FISH技术的实验操作方法，如探针和染色体制备、荧光原位杂交和染色体染色等，以及实验结果分析方法。

关键词： 染色体，荧光显微镜，物理图谱，生物素，地高辛标记的DAPI

1. 引言

分子细胞遗传学是研究染色质及染色体特性和分析染色体或间期细胞核上DNA序列的物理组织结构的一门科学。随着非放射性杂交和荧光显微镜技术的发展，多色分析已成为可能，并将极大地促进染色体研究工作。

荧光染色体分带技术中［1］［图14.1（a）］，荧光染料均一或特异性地直接结合于碱基对和染色体DNA的某些片段上，以区分不同类型的异染色质，解读染色体上DNA序列的部分信息［3］。由于未螯合的染料基本上是不发荧光的，染料与DNA结合后，其荧光性能会急剧增强，即使体积微小的和那些被原生质体及细胞壁包裹着的染色体也可以分析。荧光原位杂交技术（FISH）采用标记探针与染色体和细胞核进行原位性杂交［4］［图14.1（b）］，可将染色体组织结构的细胞生物学信息直接地与DNA序列的分子信息相结合［5，6］，因而能得到更多的信息。FISH技术可用于定位基因组中DNA序列的物理位点，将连锁群关联到特定染色体，提供染色体或染色体片段标记来鉴定染色体以及检测染色体重组现象。

在植物分子生物学研究中，FISH技术已被证实是非常有应用价值的，尤其对基因组和染色体的整体组织结构研究、了解染色体的重复序列区段特征特点及其多样性和进化历程等［2，9~12］。使用染色体FISH技术可以获得许多其他方法难以得到的结果，

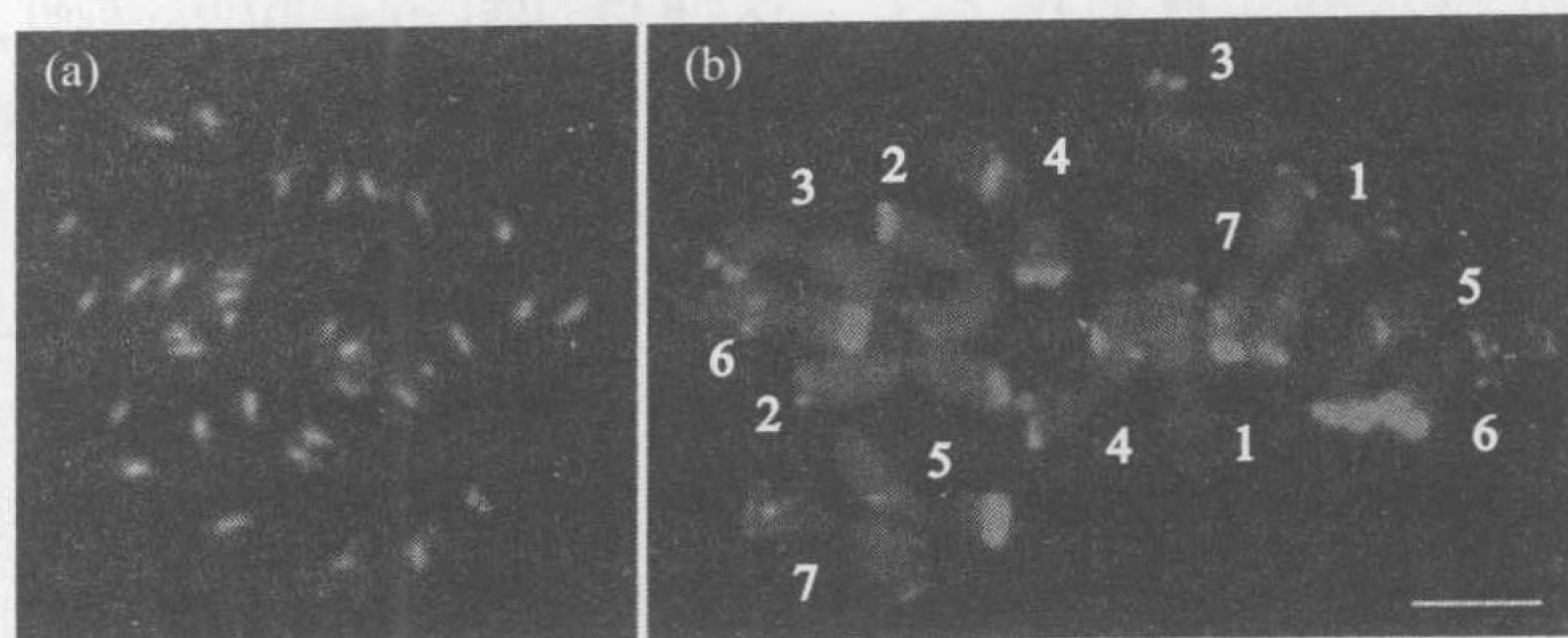


图 14.1　染色体的荧光分析。（a）荧光染色体显带：三倍杂合体鲜食香蕉根尖有丝分裂中期 33 条染色体的 DAPI 染色（UV 激发）。所有染色体中着丝粒的异染色质区域荧光较强。染色体间的一些细胞质呈微弱荧光信号（b）以高度重复 DNA 家族为探针（生物素 d-UTP 标记探针，使用偶联链霉亲和素的 Alexa594 检测，红色荧光）与黑麦有丝分裂中期染色体杂交的 FISH 示例。染色体特异性的分布方式细节性地表现出了 7 对染色体上探针。标尺 = 7 μm（见图版）

如电泳技术可以展现出重复序列一条或多条限制性酶切条带；但此法很难确定序列的位点，测序技术无法获得那些序列长且有一定同源性的重复序列的信息。FISH 技术还无需遗传分离分析，对于那些不育的作物，或树木等生长周期较长的物种，遗传分离的方法是很难进行的。FISH 技术和其他分子细胞遗传学方法、染色质组织分析及染色体模型构建等技术的兴起，对研究基因组结构、分析分裂间期和减数分裂期 DNA 序列的三维空间分布等大有帮助［13，14］。在哺乳动物尤其是人类研究中，当运用单拷贝原位杂交技术定位单基因的物理位点，源源不断地补充遗传学信息时，在植物研究中，它仍然被看成是一项专业技术［15，16］。在植物研究中，已定位的特征明显的单拷贝序列最短可短至 800bp，但是 2.5kb 或更长序列相对更易操作，为了物理定位，超过 40kb 的目标序列需要与携带目标位点染色体的两个染色单体进行可靠的杂交；否则，只有统计分析几个细胞间期的结果，才能识别杂交探针的位点。检测和鉴定转基因的染色体位点［17~20，30］，或整合到寄主基因组的病毒序列［21~23］，其情况是极其独特的，因此，需要付出更多的努力去调整 FISH 技术，以分析低拷贝或单拷贝序列，其原因如下。

首先，通过 Southern 杂交或 PCR 方法，确切地验证某一外源 DNA 分子是否已经整合到基因组中是非常困难的，有时甚至是不可能做的；第二，采用图位法定位染色体上的转基因，需要对每个转基因系都建立一个分离群体；第三，携带转基因或病毒序列的载体一般是几 kb 长，如果串联整合，为 FISH 实验提供了一个相对较小的但却可以使用的目标序列。越来越多的实验已经证明，转基因在基因组中的位置会对其表达水平和稳定性产生重要的影响，因此，了解片段插入位置很重要［23］，而开展转基因系染色体分析的一个更进一步的理由是，需要明确转基因系的染色体是否保持完整，是否出现非整倍体、多倍体、染色体重组。

染色体原位杂交最初是使用放射性标记的卫星 DNA［24，25］。现在，原位杂交几

乎完全使用基于荧光技术的非放射性方法，这使得探针的定位更准确，且可同时使用几种探针［4］。迄今为止，生物素和地高辛是 FISH 中最广泛使用的非直接性标记，其可用荧光标记的亲和素（或衍生物）或者抗体进行检测。另一种方法是使用荧光直接标记核苷酸，此法无需特殊的检测步骤，因而更加快捷且清晰，灵敏度却较间接标记法低一些。双靶标 FISH 技术是我们实验室的常用的方法，其使用红色和绿色荧光作为检测探针、DAPI 作为蓝色荧光复染染色体。而使用蓝光、远红外或者中间型荧光的三靶标或四靶标杂交技术，更多的是在人及哺乳动物细胞遗传学中应用。配比标记探针，一种探针包含一种以上标记（在探针标记的反应时或者反应后混合各个探针），不论在动物［26，27］还是植物［28］系统中，都可以结合单标记探针使用，从而提高检测目标的数目。

本章介绍的染色体制备及染色方法，可用于遗传转化后的染色体完整性及多倍性检测，也可用于 FISH 实验。本章对探针准备和标记进行了一些讨论，最后介绍了 FISH 技术检测转基因的步骤及拍照和结果分析。

2. 材料

2.1 材料固定

（1）有丝分裂中期截获剂，任选以下几种之一：

（a）冰水（尤其适用于温带植物幼苗）：淡水或瓶装水装满一个 5 ~ 15 ml 的试管的 2/3（见注 1）；剧烈摇晃至出现气泡，置于−20℃直至水开始结冰，再振荡，然后保存于冰箱。

（b）8-羟基喹啉（适用于许多物种）：制备浓度为 2 mmol/L 的水溶液（淡黄色，需 12 h 溶解）；可 4℃黑暗保存 6 个月。

（c）秋水仙素（适用于多数植物）：制备 0.05%~1%（*m/V*）的水溶液。可 4℃黑暗保存 1 个月。

（2）固定剂：新鲜制备（不超过 30 min）。三份 96% 乙醇加一份冰醋酸。

（3）5~10 ml 小管，管塞子要紧。

2.2 染色体制备

（1）酶解缓冲液：制备 10×pH 4.6 的储存液，混合 4 份 100 mmol/L 柠檬酸和 6 份柠檬酸三钠。使用前用水稀释 10 倍。

（2）酶解液：2%（*m/V*）源自 *Aspergillus niger* 的纤维素酶（Calbiochem，21947，4000 U/g），或者由 1.8% 的 Calbiochem 纤维素酶、0.2% 的“Onozuka”RS 纤维素酶（5000 U/g）及 3%（*V/V*）源自 *Aspergillus niger* 的果胶酶（使用 40% 的甘油配制，Sigma P4716，450 units/ml）共同组成的混合物。使用 1×酶解缓冲液配制。每管分装成 2~5 ml，−20℃保存（见注 2）。

（3）乙酸：10~20 ml 45%（*V/V*）和 60%（*V/V*）乙酸水溶液。

（4）载玻片：玻片浸润于 80%（*V/V*）三氧化铬的硫酸溶液中至少 3 h，蒸馏水洗

涤，风干，用前用96%的乙醇擦拭（见注3）。

（5）玻璃盖玻片：18 mm×18 mm 规格，No. 1（见注4）。

（6）解剖针及镊子（如5号）。

（7）干冰或液氮。

2.3　探针标记

（1）标记试剂盒：基于随机引物法或者缺口前移法（如 Invitrogen 和 Roche 公司产品）。

（2）标记好的核苷酸（如果试剂盒中未提供）：Roche 公司地高辛的 d-UTP 或者 Amersham/GE Healthcare 及 Molecular Probes 公司的荧光偶联 d-UTP 或 CTP。

（3）去除未标记核苷酸，酶液及盐离子的纯化管（如果试剂盒未提供，见注5）。

2.4　玻片样品预处理

（1）2×SSC：20×储存液稀释（20×配方为：3 mol/L NaCl，0. 3 mol/L 柠檬酸钠，pH 7）。

（2）RNA 酶液：用10 mmol/L Tris-HCl 配制，浓度 10 mg/ml，pH 8，分装为0. 5~1 ml，-20℃保存。使用前用2×SSC 稀释到100 μg/ml。

（3）10 mmol/L HCl。

（4）胃蛋白酶溶液（可参考注6）：10 mmol/L HCl 配制浓度 500 μg/ml（大约4000 U/mg）的储存液，0. 5~1 ml 分装，-20℃保存，使用前稀释到1~10 μg/ml。

（5）乙醇梯度溶液：用水配制成96%、80%~90%（*V/V*）及70%（*V/V*）。

（6）多聚甲醛：在通风橱中，80 ml 水中加入 4 g 多聚甲醛（电镜级），60℃加热10 min，滴加10 mol/L 氢氧化钠帮助溶解，冷却至30℃后使用，用1 mol/L H_2SO_4 将pH 调至8。

（7）塑料盖玻片：40 mm×25 mm 规格的玻片，取自可高压灭菌的塑料袋。

（8）能容纳8张玻片和50~100 ml 溶液的染色缸。

2.5　杂交混样，变性和杂交

（1）甲酰胺：分装为0. 5~1 ml，-20℃ 保存（注7）。

（2）葡聚糖硫酸酯：50%（*m/V*）水溶液，加热溶解，0. 22 μm 孔径滤膜过滤除菌；0.5~1 ml 分装，-20℃保存。

（3）SDS 溶液：10%（*m/V*）十二烷基硫酸钠（也称月桂醇硫酸酯钠盐）水溶液，过滤除菌，室温保存。

（4）鲑鱼精 DNA：1 μg/μl 超声波或高压处理的 DNA（也可用鲱鱼精或者大肠杆菌 DNA）；0. 5~1 ml 分装，-20℃保存。

（5）20×SSC 溶液：3 mol/L NaCl，0. 3 mol/L 柠檬酸钠，调节至 pH 7，如未经高压灭菌，使用 0. 22 μm 孔径滤膜过滤除菌，0. 5~1 ml 分装，- 20℃ 保存。

（6）EDTA：100 mmol/L，pH 8；0. 5~1 ml 分装，- 20℃保存。

（7）塑料盖玻片：25 mm× 25 mm 规格的玻片，取自可高压灭菌的塑料袋。

2.6 严谨洗涤及探针检测

（1）2 ×SSC 及 0.1×SSC：使用 20×储存液（见 2.4 节）；每次准备 500 ml 并预热至 45℃。

（2）甲酰胺：40 ml 分装，-20℃（见注 7）。

（3）严谨性洗涤液：准备 100 ml 洗涤液，高严谨度洗涤液使用 20% 甲酰胺，0.1×SSC，低严谨度洗涤液为 20% 甲酰胺，2×SSC（见注 8）。

（4）检测缓冲液：4×SSC 中加入 0.2%（*V/V*）Tween-20，准备 500 ml 并预热到 45℃。

（5）BSA 封闭液：检测缓冲液中加入 5%（*m/V*）牛血清白蛋白。

（6）检测剂：每个玻片制备 50 μl 检测剂（见注 9）。如果检测两个标记，则将两种试剂混合一并加入检测缓冲液。

（a）地高辛标记：抗地高辛（FAB-片段）偶联荧光素（Roche）；一般稀释度为 1∶200（见注 10）；

（b）生物素标记：avidin、streptavidin、extra-avidin 或 antibiotin 偶联相应的荧光素（如 Vector、Sigma、Molecular Probes 或 Roche）；一般稀释度为 1∶200~500（见注 10）。

（7）塑料盖玻片：25 mm× 40 mm 规格的玻片，取自可高压灭菌的塑料袋。

（8）染色缸，用于玻片洗涤，能至少容纳 100 ml 溶液。

2.7 复染和封片

（1）DAPI 染液：制备 0.1mg/ml 的 2′，6-diamidino-2-phenylindle 水溶液，-20℃保存，使用 McIlvaine 缓冲液（18 ml 100 mmol/L 柠檬酸及 82 ml 200 mmol/L Na_2HPO_4，pH 调节为 7）稀释到 2~4 μg/ml，分装成每管 1 ml，-20℃保存。

（2）抗衰减剂：市场有售，如 Citifluor AF1（Agar）、Vectashiled（Vector）、Slow Fade（Molecular Probes）或者 Fluorguard（Sigma）。

（3）玻璃盖玻片：24 mm×30 mm 或者 40 mm No. 0（见注 4）。

3. 方法

原位杂交的基本操作方法（图 14.2）演化自 Southern 杂交：标底是玻片上的染色体和细胞核，探针是带标记的待测 DNA 序列［本书中即是转基因和对照，图 14.3（a）］。对探针和染色体分别或同时进行变性处理，以便产生杂交分子（图 14.2）。多数实验方案采取杂交过夜的方式，这对于低拷贝 FISH 非常重要。而对检测重复 DNA 序列，杂交时间有几小时就足够了。正如 Southern 杂交一样，需要经过数次的洗涤，目的是去除未结合的探针并鉴定杂交的紧密性，也就是鉴定探针和目的 DNA 序列的相似度，而这是在一个双链 DNA 螺旋中保持稳定杂交的必要条件。为了准备染色体，除了杂交温度、钠离子浓度和洗涤液等条件外，一种双螺旋去稳定剂如甲酰胺也可以调控杂交紧

密度。在直接 FISH 技术中，染色体可以马上复染，常用 DAPI 复染；在使用荧光素和地高辛标记的非直接性 FISH 中，需要使用免疫细胞化学的方法做检测。

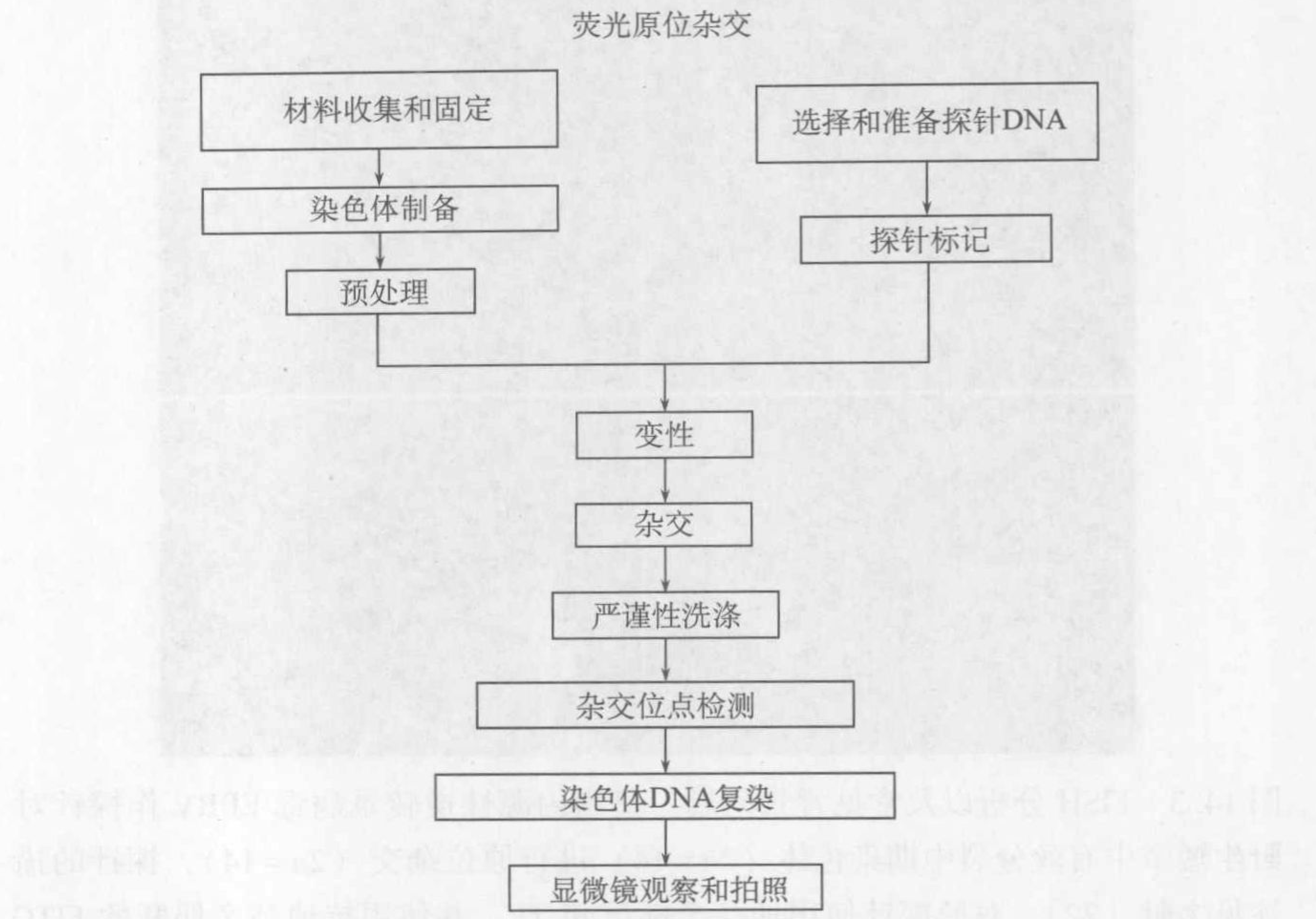


图 14.2　荧光原位分析流程图

染色体荧光染色［图 14.1（a）］，按照染色体固定和制备的操作，检测转基因的株系及个体的倍性水平（见 3.1 节和 3.2 节），然后进行复染、封片和分析等步骤（见 3.7 节和 3.8 节）。

3.1　材料固定

制备含有大量干净而铺展的分裂中期染色体，是保证 FISH 和染色体染色成功的重要因素。用于固定和染色体制备的植物材料必须是健康、无病害并生长旺盛的。它可以是任何分生组织，但在转基因植株生长过程中，用什么材料做检测，则取决定于试验的时间，可以取幼苗的根尖、盆边缘老株上新长的根尖，或者水培植株的根尖。对某些物种来说，也可以选用嫩枝、叶片或新芽的分生组织细胞。

在多数情况下，获得最大数量的分裂中期的染色体对试验成功是很重要的。为了获得更多的处于分裂中期的细胞，常常需要对材料进行预处理，使染色体发生浓缩，并破坏纺锤体微管，以获得充分分散的染色体。纺锤体微管抑制剂，如秋水仙素（广泛用于染色体计数）可以形成高度浓缩的染色体，另一些染色体浓缩剂，如冰水或者 8-羟基喹啉，能产生更为伸展的染色体，以更适合于 FISH 分析。

（1）所有步骤均使用干净的镊子在干净的容器中进行。在收集和预处理阶段（步骤 2~4），避免将材料接触固定剂和化学药品（见注 11）。

（2）选择合适的植株材料以获得分裂期细胞。确认材料生长于适宜条件下。

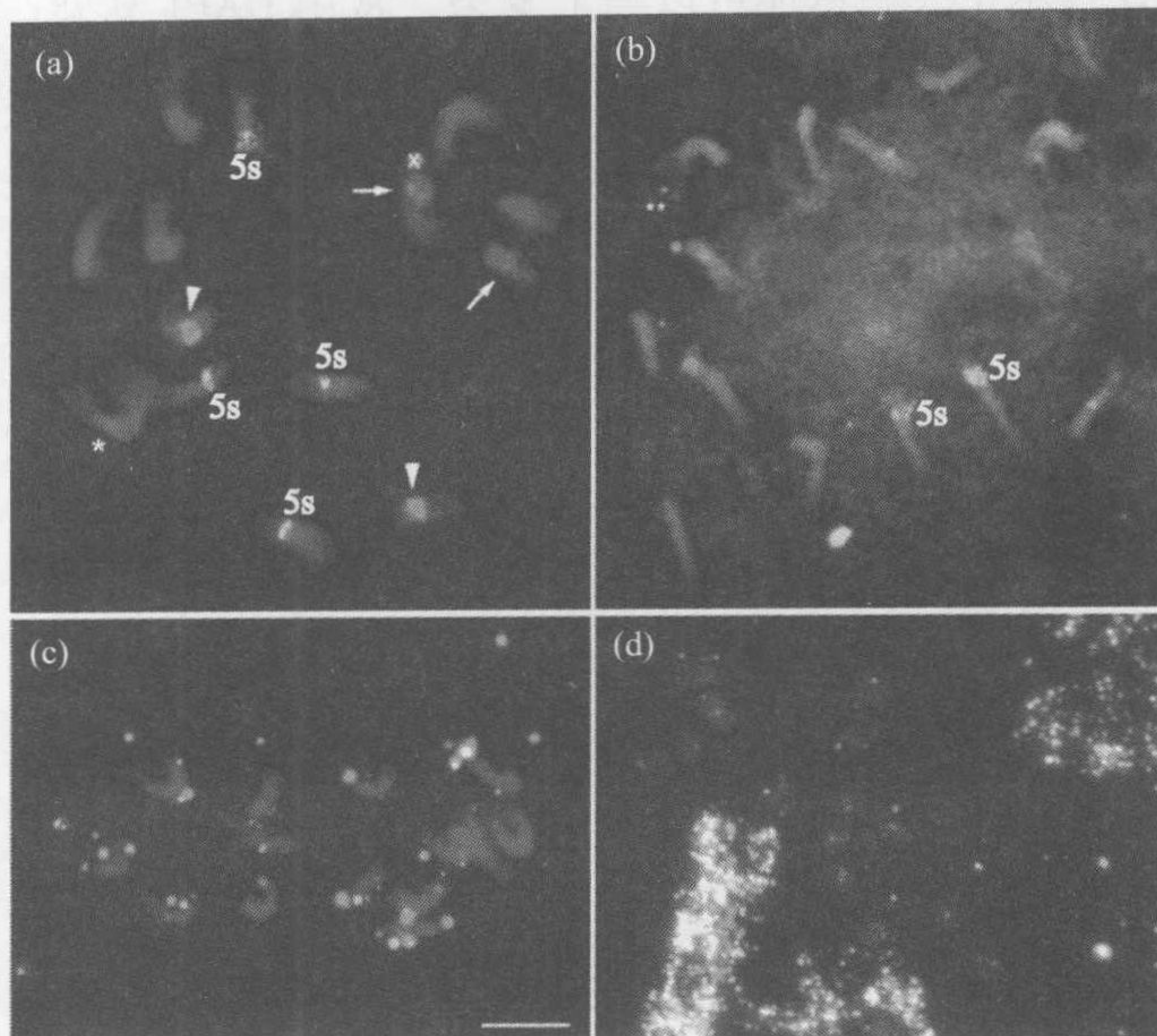


图 14.3　FISH 分析以及常见背景问题。使用内源性逆转录病毒 EPRV 作探针对野生矮牵牛有丝分裂中期染色体（$2n=14$）进行原位杂交（$2n=14$），探针的描述见文献［22］，对照探针使用地高辛标记 dUTP，并使用抗地高辛偶联的 FITC 检测，蓝光激发下呈绿色荧光。染色体用 DAPI 复染（UV 激发下呈蓝光）。每张图片包含了数码相机摄取的三张荧光图片，并使用 Adobe Photoshop 进行了叠加。(a) 延展良好并只有少量细胞质和背景杂交的有丝分裂中期染色体可以很清晰地看到 FISH 信号：在 4 对不同的染色体着丝粒上检测到 4 个 5S rDNA 位点（绿色），两主（三角键）两次（箭头）EPRV 位点（红色）。EPRV 次信号带在每条染色质上都表现为一种不规则的"双点"状信号，说明有几个拷贝的插入，EPRV 主信号带则呈现出类似数十个病毒拷贝的整合现象。染色体（X）附近非特异性 ERPV 信号或者表现为中空的柱形信号（＊）的，可以不予考虑。(b) 细胞质的背景荧光干扰了 FISH 信号。在一个不常见的末端位置，同源染色体上没有对应信号的双点强荧光信号（＊＊）是错误信号。(c) 染色体上或者染色体附近强的非特异性背景荧光干扰了正常信号。(d) 星点状非特异性强红光和绿光信号表明探针已经降解，从而导致标记的聚集。多数染色体着丝粒的绿色对照探针微弱的 FISH 信号依然可见，正常 EPRV 信号却没有被检测到。注意非特异性背景信号表现为边界清晰的圆形，而正常杂交信号由非均匀分布的小点组成。注意区别次 EPRV 信号（a）与双点荧光（b）、主 EPRV 信号（a）与非特异性的大点荧光（d）。标尺 = 10 μm（见图版）

（3）选择如 2.1 节中所述细胞分裂期阻滞剂加入试管中。

（4）将根（1~2 cm 长）或者芽转移至 3~5 ml 的分裂期阻滞剂中（见注 12），试剂用量是材料的 5 倍，然后将盖子拧紧。

（5）按如下培育：

（a）冰水：24 h

（b）8-羟基喹啉：生长所需温度下放置 30~45 min，然后 4℃、30~45 min。

（c）秋水仙素：室温 2～4 h 或者 4℃、12～16 h。

（6）将材料迅速吸干，放入新鲜固定剂中。为保迅速渗透，确保固定剂没有水分污染。除管子上用（油墨）毡笔做标记外，用铅笔在便签或小纸片上做好记号，然后将纸片一并放入固定剂中。

（7）室温放置 1 h，然后保存于 4℃ 或者 −20℃（见注 13）。

3.2　染色体制备

无论是荧光染色还是 FISH，分裂期和分裂间期的染色体制备均于载物片上进行。建议使用蛋白水解酶对材料进行预处理，以去除细胞壁和细胞质，再将样品置于载玻片上，滴上乙酸，然后盖上玻片压片。所有操作均于室温下进行，除非是特殊说明。在洗涤和材料准备时使用小培养皿，方法见 2.2 节。

（1）用酶缓冲液洗涤植物材料上的固定剂两次，每次 10 min。

（2）转移植物材料到 1～2ml 酶解液中，依据材料的不同在 37℃ 温育 30 min 到 2 h（见注 2）。

（3）将植物材料从酶解液转移至酶缓冲液。

（4）将 2~3 份材料移至 0. 5 ml 45% 的乙酸中，放置几分钟。如果材料太软，此步骤可以省略。

（5）将载玻片浸泡到 96% 的乙醇中再用无毛布擦干。载玻片上滴一滴 60% 乙酸。然后将一小块根尖或其他的材料放入乙酸中。可根据需要更换乙酸。

（6）在解剖镜下，撕开组织或用玻棒轻敲组织并去掉颗粒物。处于分裂期的细胞更易浮起。

（7）用手纸擦盖玻片后放到玻片上，相差显微镜观察。为获得最适片子，用手（拇指）压片，用力或轻或重，根据需要。也可敲打盖玻片（译注：建议用皮头铅笔的橡皮头敲）。

（8）显微镜下观察细胞密度和分裂中期指数，将比较好的样品放置到金属板上置于干冰中 5～10 min（不要过长时间）。用剃须刀刀尖轻轻挑开盖玻片，然后风干。

（9）相差显微镜下浏览未封片的玻片。寻找充分分散、不成堆聚集的细胞核，玻片应没有表层膜和杂质。分裂中期染色体应该充分分散，没有细胞质和杂质残渣等。对每张玻片进行记录以优化下次制片过程。小染色体可以通过 DAPI 染色来检测（见 3. 7 节）。

（10）在玻片上划上线以标记样品所在玻片上的位置，因为在其后的步骤中，样品位置在潮湿的玻片上是看不见的。

（11）玻片于 4℃ 干燥保存数天或者于−20℃ 保存数月（见注 13）。

3.3　探针标记

因为基于随机引物法或缺口前移原理的相关操作说明在商用试剂盒已有提供，本章

不再讲述标记 DNA 的实验操作方案。直接 PCR 标记法也是常用的方法，这种方法是在扩增克隆的特定片段，或扩增总基因组 DNA 的特定片段时，结合引入带标记的分子。为保证 FISH 的成功，必须在探针中引入比例合适的带标记分子，以便于检测。为使聚合酶作用更有效，带标记的核苷酸（dUTP 或 dCTP）与非标记 TTP 或 CTP 按 1：2 混合。试剂生产商常常提出标记核苷酸的推荐浓度和稀释度，以获得最佳整合效率。这是一个标准实验的起点要求量，不过一些非常昂贵的标记核苷酸，尤其是刚打开的还未经多次冻融的试剂，其用量可以减少至推荐用量的 50% ~ 70%。另一个重要因子是标记后探针的长度。探针不能太长，一般是 200~600 bp，以免不能渗透进染色体的 DNA 中。随机引物法和缺口前移法产生的探针长度恰好适宜于 FISH，不过，有时可能需要对缺口前移酶体系中的 DNA 酶组分加以调整。用 PCR 法标记较大的插入克隆，可能不会得到好的探针。

另一个影响标记成功与否的因素是模板 DNA 的纯度，以及用于加标记的 DNA 模板序列的长度。使用克隆片段时，要确保小量制备的 DNA 是纯净的、未受细菌污染，这样插入片段才能被干净、完整地酶切。对较小的插入片段（100bp 到 2kb），推荐使用 M13 测序通用引物进行 PCR 扩增，这样能获得非常纯净的模板 DNA。在用随机引物法或切口前移法进行标记前，最好将 PCR 产物经电泳后割胶回收目的条带，以纯化模板 DNA。对较长产物，小量提取的 DNA 可以在质粒线性化或酶切目的片段后直接标记。不过，我们发现大的 DNA 分子常常不会是很好的模板，可能的原因是，如果聚合酶不在 DNA 模板分子的末端停止，酶就无效了。因此，将大 DNA 分子通过超声、加热或者酶切的方法处理后，再进行标记效果会更好（见［4］、［19］）。

检测转基因片段时，推荐使用生物素标记法［图 14.3（a）］，因为生物素是最小的半抗原，通常最易整合，市场上也有销售专用的生物素试剂盒。其次，许多不同的亲和素、链霉亲和素或者抗生物素抗体，能与荧光染料紧密而稳定的连接，这些都可以从市场上购得（如 Alexa dyes 和 Molecular Probes 公司）。作为第二对照或者指示探针，可用地高辛或直接荧光染料标记，建议使用 5S rDNA，因为它广泛存在，并且在许多物种中都有主荧光和次荧光位点［图 14.3（a）］，能提供最好的 FISH 实验对照。45S rDNA 也可以使用，但是常常有强荧光位点出现，其荧光信号强过转基因的杂交信号。另一个非常好用的是重复 DNA 序列，它可以帮助鉴定染色体。

3.4 玻片材料预处理

开始原位杂交前，应将玻片材料进行预处理以增强探针向目标位点的渗透，如用胃蛋白酶或蛋白水解酶处理表面蛋白，并减少非特异性探针与检测试剂的结合，如 RNA 酶和胃蛋白酶/蛋白水解酶处理。之后将样品用多聚甲醛和乙醇再固定，使样品经多次洗涤后仍稳定存在。

（1）所有步骤均于室温下染色缸里进行，除非其他说明。

（2）在每个玻片划标记处加入 200 μl RNA 酶，盖上塑料盖玻片，在保湿盒中温育 1 h。

（3）去掉盖玻片，将载玻片在 2×SSC 中洗涤两次，每次 5 min。

（4）玻片放入 10 mmol/L HCl 摇晃 2 min 左右，每张玻片迅速加入 200 μl 胃蛋白酶液，盖上塑料盖玻片，37℃温育 10 min（见注 6）。

（5）在蒸馏水中洗脱盖玻片，然后用 2×SSC 洗玻片两次，每次 5 min。

（6）将玻片放入通风橱中盛有多聚甲醛固定剂的染色缸中放置 10 min。

（7）2×SSC 洗玻片两次，每次 5 min。

（8）浓度梯度乙醇逐级脱水（70%、90% 和 96% 各 2 min），风干。

3.5　杂交混合变性和杂交

（1）离心管中准备杂交液，见表 14.1，充分混合。

表 14.1　杂交液配方

组分	终浓度	每张玻片的用量/μl	8 张玻片的用量[a]/μl
100% 甲酰胺	50%[b]	20[b]	180[b]
20×SSC	2×	4	36
50% 硫酸葡聚糖	10%	8	72
鱼精液鲑 DNA 1 μg/μl	0.025 μg	1	9
100 mmol/L EDTA	1.25 mmol/L	0.5	4.5
10% SDS	0.125%	0.5	4.5
总量		34	306

a. 比实际多配制一张玻片所需的杂交液。所以此处为 9 张玻片的用量。

b. 低严谨度杂交时，分别用 40%，16 μl 和 134 μl，然后加水至终体积。

（2）在离心管中加入 34 μl 杂交液、2 μl 转基因探针、1 μl 指示探针或对照探针，蒸馏水补齐至 40 μl，作为探针混合液。

（3）探针变性，放入 70℃水浴锅 10 min，然后置冰上 5 min。

（4）将探针混合液滴到玻片上染色体所在位置，用塑料盖玻片盖好，注意去除所有气泡，如有气泡，需要揭开盖玻片重新盖上。

（5）将玻片放到加热块上，升温至变性所需温度，一般是 75℃、8 min。根据不同物种、不同制备方法和材料储存时间的不同，变性温度在 70 ~ 95℃之间，时长 6 ~ 12 min（见注 14）。

（6）降温至 37℃ 放置 10 ~ 20 min，将温度保持在 37℃准备杂交。

（7）如果加热板可以保湿，可将玻片保留在加热板上，如果不行，将玻片转移到烘箱的保湿盒或者水浴锅中用于杂交。注意不要让样品干掉，也不要让冷凝水积累到样品上。过夜（16 h）。

3.6　严谨性洗涤和杂交位点检测

（1）配制洗涤液和检测缓冲液，见 2.6 节。

（2）从杂交中取出玻片，检查样品是否蒸干或者被冷凝水打湿。

（3）在 42℃、2×SSC 中将盖玻片浮去，注意玻片间不要刮擦。

（4）玻片于42℃、2×SSC中洗涤2 min。

（5）玻片于42℃ 严谨性洗涤液中温育两次，每次5 min，准确测定并记录洗涤液的温度。使用0.1%×SSC高严谨度洗涤或者2×SSC低严谨度洗涤（见注8）。

（6）玻片于42℃的2×SSC中洗涤三次。

（7）从水浴锅中拿出玻片，自然冷却10 ~ 15 min。

（8）玻片转移至检测缓冲液放置至少5 min。

（9）在每个玻片的记号处加入200 μl的BSA，盖上塑料盖玻片放置5 ~ 30 min。

（10）根据探针标记准备检测液（见2.6节），去掉BSA，吸取50 μl检测液到玻片上，盖上塑料盖玻片，37℃保温箱温育60 min（见注9）。

（11）去掉盖玻片，检测缓冲液洗涤三次，每次5 min。

3.7 复染及封片

大多数样品需要进行DNA复染来观察染色体。复染染料颜色必须与探针颜色不同，其信号也不能太亮使杂交信号模糊。因此，建议先染色再封片。一些实验操作将复染和封片合并为一步，这样做省了一个步骤，但是可能导致染色过度和背景值偏高。第一个荧光FISH实验使用碘化丙啶染色，当用蓝光或者绿光作为激发光时，染色体呈红色。双靶标FISH实验中，当用红色和绿色标记荧光探针时，使用DAPI在紫外激发下呈蓝光比较合适（图14.3），因为它常常能同时显示出异染色质带型。在制备染色体过程中，DAPI也是一种检测染色体的质量和数目的很好染料，当染色体很小时它特别有用［图14.1（a）］。

（1）向载玻片上滴入50 ~ 100 μl的染色液，用塑料盖玻片盖好，然后于室温、黑暗下放置10 min（见注5）。

（2）移除盖玻片，用检测缓冲液短暂洗涤（见4.2.6节）。

（3）吸干缓冲液，向盖玻片上滴入一滴抗荧光淬灭封片液，然后盖上玻璃盖玻片。配合滤纸片用手挤压玻片以去除多余封片液（见注15）。

（4）玻片观察。淬灭剂可能需要几个小时才能渗透至样品中，因此可放置过夜后再进行观察和拍照。

3.8 观察和拍照

使用落射荧光显微镜观察探针杂交点和染色体染色。本章不是对显微镜的使用进行说明，只是对一些常见问题和解决办法提出如下建议。

（1）即使使用很好的荧光抗衰剂封片，荧光染料和原位杂交信号也可能非常微弱并会迅速衰减，因此显微镜应置于一个全黑暗房间的固定台面上，并且摆放要便于操作。确保系统合理放置，调整光源居中。

（2）确保仪器和浸油以及UV为荧光专用。浸油应室温黑暗放置。运输车内阳光的热量、混合油、浸油吸水等都会促使浸油自发荧光或者不透UV。

（3）一般情况下，最好使用针对单一荧光的特定滤波片。多通道滤波片也可以买到，但由于不同荧光的光强不一样导致这种玻片不太好用，并且不同荧光间的杂交激发

常使结果很难分析。确保滤波片没有随着使用时间的增加而发生特性改变。

（4）使用胶片或者数码相机拍照。两者都能获得满足发表标准的图像分辨率。但是，必须注意的是，不管多贵的数码系统都无法补偿显微镜直接观察的优势。当使用胶片时，彩印胶片比幻灯片更好，因为它有更好的曝光范围，并且价格和打印都更便宜。

（5）玻片应一直放在抗衰减剂中，这样能极大地阻止荧光信号的衰减。

（6）记录荧光信号前要特别小心，不要让染色体信号尤其是微弱的 FISH 杂交信号衰减。低倍镜下观察一般不会衰减信号。但到 63× 和 100× 时衰减很迅速。有必要先安装好照相系统，焦平面一旦聚焦就可迅速按下曝光键。先将 FISH 信号拍照记录好，在找到满意的 FISH 杂交信号前，不要用 DAPI 观察染色体荧光。

（7）当观察一个肉眼几乎看不见的弱荧光信号时，聚焦图像会很困难。可以在红光和绿光焦平面之间轮换着观察。DAPI 不便这样操作。

（8）不论使用数码相机还是普通胶片，使用图像处理软件（如 Adobe Photoshop、Corel Draw 或者其他类似软件包）分析，叠加和组合各种图片是最方便的。但是，必须注意图片不可过度处理。责任人必须清楚地意识到对实验室成员的图像处理是要负责任的！

3.9　转基因的 FISH 分析

实验中最困难的部分可能是判断所观察或记录的信号是否真实可信，尤其是低拷贝转基因的信号。

（1）检查有丝分裂中期是否完整，染色体形态是否保存完好。染色体可以稍显臃肿，但不能太发散。染色体应该没有破损，没有洞隙或扭曲。

（2）确保对照探针有预期结果。

（3）注意观察背景信号和非特异性交叉杂交信号，它们可能模糊掉真正的 FISH 信号［图 14.3（b）和图 14.3（c）］。任何焦平面外产生清晰边缘的信号都可以去除［见图 14.3（a）］。星点状强信号［图 14.3（d）］常常意味着探针或检测剂已经变质。

（4）统计染色体上的转基因 FISH 信号。分析若干有丝分裂中期细胞，可能的话，鉴定出染色体和 FISH 信号的位置。在一个正常的二倍体细胞中，一个二倍体位点应该在同源基因所在的两条染色质的相同位点上产生荧光信号（见注 16）。当目的条带小于 50kb 时，由于染色体的螺旋和挤压，不太可能在同一个分裂中期细胞中观察到所有位点的信号，所以在任意某个分裂中期细胞中，不要指望看到所有的信号点。不过观察 5~10 个或更多分裂中期细胞后，应该能确定哪个是真实信号，哪个是背景信号。当观察到荧光强度高和可靠性好的信号时，表明几个转基因以串联的方式整合到基因组中了［[18]、[19]，见图 14.3（a）］。

（5）最重要的一点是要比较同一个探针或者同一批实验所得到的玻片，以此排除实验失败、实验污染或探针标记无效、抗体稀释度不合适或者其他试剂使用不当等因素。

4. 注释

注 1：水质对于种子萌发和冰水处理非常重要。氯处理水、氨处理水或者管道里的重金属都会降低有丝分裂中期相的比率，因此建议使用瓶装水。

注 2：对不同的样品，向酶解液中添加如果胶酶（0.1%~1%溶液）或者复合多糖酶（0.1%~0.5%溶液），或者改变酶解液中不同酶的配比，可能会获得更理想的效果。

注 3：高质量的玻片对于清晰的制片是很关键的。强酸处理玻片不仅可以去除油脂，还能去除玻片表面的阴离子，使细胞核和染色体黏附到玻片上。可以将洗过的玻片在相差显微镜下观察，帮助进一步去除表面杂质。如果没有铬酸，可用 6 mol/L HCl 清洗。也可以使用经过特殊表面处理的玻片，但有的可能会提高背景值，有的价格较昂贵。

注 4：好的样品常常散落在盖玻片周边，因此推荐使用小号盖玻片（18mm×18mm）制样（2.2 节和 3.2 节），用大号盖玻片（如 24 mm×30 mm 或 40 mm）封片（2.7 节和 3.7 节）。

注 5：乙酸钠或者氯化锂进行乙醇沉淀的方法可以用来代替柱子纯化。

注 6：如果制品干净并且每个染色体都能相互区分开，这一步可以省略。调整样品浓度。

注 7：甲酰胺的等级要高，但不必用最高等级的。为防止试剂在敞开玻瓶中降解，在-20℃保存前，可将杂交混合液分装为每管 1 ml（第 2.5 节和第 3.5 节），洗涤液分装为每管 40 ml（第 2.6 节和第 3.6 节）。如果分装物不能完全冰冻，说明不纯净，应使用其他级别的甲酰胺或者调换批号。

注 8：对于低拷贝转基因，建议降低杂交严谨度，同时注意交叉杂交错配问题。

注 9：在光照（能量会损失荧光分子）下，大多数荧光衰减非常迅速。在制备溶液和操作玻片时都要避光。

注 10：抗体的稀释度变化很大，即使是同一厂商的不同批次试剂也一样。抗体浓度在使用时必须优化。通常的稀释度从 1∶50~1∶600。

注 11：玻璃器皿、植物材料取样工具或者环境（如冰箱）中空气的痕量固定剂将会降低细胞的有丝分裂中期相比率。不要使固定剂或固定剂蒸气交叉污染其他植物材料。

注 12：种子萌发新根后，如果这些种子不再用于播种，最好将整粒种子用冰处理和固定。

注 13：固定好的材料，只要不受热，可以保存数周到数月再进行染色体制备。但即使冷藏时，材料也会变硬，去除细胞质将变得困难。当 FISH 不久就要在实验室或者远程实验室开展时，储藏或寄送做好的染色体片子（3.2 节）常常是更好的选择。

注 14：确保所有染色体 DNA 已被变性是非常重要的一步。但是处理时间过长或温度过高，又会改变染色体的形态。许多 PCR 仪经改造后能放置玻片［29］，这对于精确的控制玻片温度和反应时间非常有好处。另外可取的方法包括使用恒温加热盘或者将玻

片置于水浴锅盘中，这两种情况必须在样品旁放置温度计来精确地控制玻片温度。有一些实验操作是单独变性材料，先将玻片浸在70%甲酰胺和2×SSC的混合液中，60～80℃放置6～10 min，之后再加入杂交混合液并盖上盖玻片。

注15：如需长时间的保存或运输，可以用树脂或者指甲油将玻片封好。如果荧光变得非常微弱，尤其是经过长时间保存后，可去掉盖玻片，将玻片在检测缓冲液中简单洗涤并重新封片（有时有必要用DAPI重新染色）。

注16：注意，有些转基因可能只出现在两条同源染色体的某一个上，或者整合到几个位点中。

致谢

感谢莱斯特大学的John Bailey提炼本实验室的FISH操作方案，以及Pat Heslop-Harrison阅读手稿并提出意见和建议。感谢实验室的Chee How Teo和Alessandra Cotento，以及德国不伦瑞克联邦生物研究中心的Katjia Richert-Poeggeler提供我们合作项目的照片。感谢全球挑战计划EU-FP5网络PARDIGM QLK3-CT-2002-02098和FAO/IAEA合作项目的资助。

（董　波　周　波　译）

参考文献

1. Schweizer，D.（1981）Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genet.* 57，1-14.
2. Contento，A.，Heslop-Harrison，J. S. and Schwarzacher，T.（2005）Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid Triticeae. *Cytogenet Genome Res.* 109，34-42.
3. Kowalska，A.，Bozsaky，E.，Ramsauer T.，Rieder，D.，Bindea G，Lorch T，Trajanoski Z. and Ambros P. F.（2007）A new platform linking chromosomal and sequence information *Chromosome Res.* 15，327-339.
4. Schwarzacher T. and Heslop-Harrison J. S.（2000）*Practical in situ Hybridization.* Bios，Oxford，213 + xii.
5. Schwarzacher，T.（2003）DNA，chromosomes，and in situ hybridization. *Genome* 46，953-962.
6. Kato，A.，Vega，J. M.，Han，F，Lamb，J. C. and Birchler，J. A.（2005）Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8，148-154.
7. Hasterok，R.，Marasek，A.，Donnison，I. S.，Armstread，I.，Thomas，A.，King，I. P.，Wolny，E.，Idziak，D.，Draper，J. and Jenkins，G.（2006）Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using BAC landing with fluorescent in situ hybridization. *Genetics* 173，349-362.
8. Forsstrm，P. O.，Merker，A. and Schwarzacher，T.（2002）Characterization of mildew resistant wheat-rye substitution lines and identification of an inverted chromosome by fluorescent *in situ* hybridization. *Heredity* 88，349-355.
9. Heslop-Harrison J. S.（2000）. Comparative genome organization in plants：from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* 12，617-635.
10. Brandes，A.，Thompson，H.，Dean，C. and Heslop-Harrison，J. S.（1997）Multiple，repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chromosome Res.* 5，238-246.
11. Dechyeva，D.，Gindullis，F. and Schmidt，T.（2003）Divergence of satellite DNA and interspersion of dispersed repeats in the genome of the wild beet *Beta procumbens*. *Chromosome Res.* 11，3-21.
12. Lim，K. Y.，Kovarik，A.，Matyasek，R.，Chase，M. W.，Knapp，S.，McCarthy，E.，Clarkson，J. J. and

Leitch, A. R. (2006) Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana section Alatae*. *Plant J.* 48, 907-919.

13. Schwarzacher, T. (1997) Three stages of meiotic homologous chromosome pairing in wheat: cognition, alignment and synapsis. *Sexual Plant Reprod.* 10, 324-331.
14. Weierich, C., Brero, A., Stein, S., von Hase, J., Cremer, C., Cremer, T. and Solovei, I. (2003) Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human DNA murine lymphocutes. *Chromosome Res.* 11, 485-502.
15. Desel, C., Jung, C., Cai, D. G., Kleine, M. and Schmidt, T. (2001) High-resoltion mapping of YACs and the single-copy gene *Hs*1pro-1 on *Beta vulgaris* chromosome by multi-colour flurosecence *in situ* hybridization. *Plant Mol. Biol.* 45, 113-122.
16. Fransz, P. F, Stam, M., Montijn, B., Ten Hoopen, R., Wiegant, J., Kooter, J. M., Oud, O. and Nanniga, N. (1996) Detection of single-copy genes and chromosome rearrangements in *Petunia hybrida* by fluorescence in situ hybridization. *Plant J.* 9, 767-774.
17. Pedersen, C., Zimny, J., Becker, D., Jhne-Grtner, A. and Lrz, H. (1997) Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 94, 749-757.
18. Leggett, J. M., Perret, S. J., Harper, J. and Morris, P. (2000) Chromosomal localization of cotransformed transgenes in the hexaploid cultivated oat *Avena sativa* L. using fluorescence in situ hybridization. *Heredity* 84, 46-53.
19. Salvo-Garrido, H., Travella, S., Schwarzacher, T, Harwood, W. A. and Snape, J. W. (2001) An efficient method for the physical mapping of transgenes in barley using *in situ* hybridization. *Genome* 44, 104-110.
20. Salvo-Garrido, H., Travella, S., Bilham, L. J., Harwood, W. A. and Snape, J. W. (2004) The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping. *Genetics* 167, 1371-1379.
21. Harper G., Osuji J. O., Heslop-Harrison J. S. and Hull R. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255, 207-213.
22. Richert-Pggeler, K. R., Noreen, F, Schwarzacher, T, Harper, G. and Hohn, T. (2003) Induction of infectious Petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. *EMBO J.* 22, 4836-4845.
23. Staginnus, C., Gregor, F, Mette, M. F., Teo, C. H., Borroto-Fernández, E. G., Laimer da Camara Machado, M., Matzke, M. and Schwarzacher, T. (2007) Endogenous pararetroviral sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species. *BMC Plant Biol.* 7, 24.
24. Gall, J. G. and Pardue, M. L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *P. N. A. S. USA* 63, 378-383.
25. John, H. A., Birnstiel, M. L. and Jones, K. W. (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587.
26. Nederlof, P. M, van der Flier, S., Wiegant, J., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ploem, J. S. and van der Ploeg, M. (1990) Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 11, 126-131.
27. Müller S., Neusser M. and Wienberg J. 2002. Towards unlimited colors for fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) *Chromosome Res.* 10, 223-232.
28. Mukai Y., Ankara Y. and Yamamoto M. 1993. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexa-

ploid wheat by multicolour fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36, 489-494.

29. Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T, Anamthawat-Jónsson, K., Leitch, A. R., Shi, M. and Leitch, I. J. (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* 3, 109-115.
30. Kohli A., Twyman R. M., Abranches R., Wegel E., Stoger E. and Christou P. (2003) Trans-gene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol.* 52, 247-258.

第 15 章　实质等同性：转录组学

María Marcela Baudo　Stephen J. Powers
Rowan A. C. Mitchell　Peter R. Shewry

摘　要：在西欧，转基因作物想获批商业生产，需要向监管部门提供它们与常规育种作物实质等同性的证明。建立转基因作物与常规育种作物实质等同性的途径之一就是比较两者发育过程的籽粒和其他组织的转录产物特征，以发现任何非预期转基因效应。本章提出了在转录水平上比较小麦籽粒和叶片材料的详细方法，并以胚乳特异启动子控制的外源谷蛋白基因转化系的研究为例，阐述研究的方法。结果表明，这些转基因系转入的基因，包括那些编码标记基因，对内源基因的表达没有任何显著的预料之外的影响，因此，转基因植物与其供体亲本是实质性等同的。

关键词：面包小麦，转基因学，转录组学，转基因表达，实质等同性，谷蛋白

1. 引言

在 21 世纪，如何养活不断膨胀的世界人口是一个主要挑战［1］。毫无疑问，转基因技术将对提高作物产量和质量做出重要贡献。然而，由于公众在某种程度上对转基因技术安全存在担忧，因此，在西欧，转基因作物的接受程度很低。监管部门允许转基因作物商业化生产应用之前，也需要其详细的研究资料，包括证明它们与常规育种产生的作物是实质等同性的［2］。

虽然“实质等同性”很难精确定义，但通常被认为是指在同样生长条件下转基因系的成分，应该与常规育种品系处于同一范围之内。

使用定制的 cDNA 芯片［3~5］，我们鉴定了转基因小麦和常规小麦之间的转录组实质等同性，这两种小麦由胚乳特异性启动子驱动，表达相同的高分子质量谷蛋白亚基基因。通过对这组数据的分析，首先鉴别出显著差异表达的基因（$P<0.05$），然后从中挑取变化倍数大于临界值（1.5）的基因。转基因系还表达了 *bar* 和 *uidA* 标记基因，并含有 amp^{R} 基因和质粒骨架序列［6~8］。因此，我们也比较了导入整个质粒，或者切除后仅包含高分子质量谷蛋白亚基基因 DNA 片段，以及仅含 *bar* 选择标记基因的转基因系［5］（见注 1）。结果表明所研究的转基因的表达，对麦粒发育期整个基因组的表达在统计上没有显著的影响，特别是在常规育种的姐妹株系（sibling lines）之间产生更大差异时，如显著表达差异基因数和倍数不同时，也无转基因表达显著影响的证据［5］。

这里叙述的方法都是为利用 cDNA 芯片系统而研发的。这类芯片仍然被广泛地使

用，特别适用于小规模分析少量候选基因，通常称“精品阵列”。然而，多数大规模基因表达研究现在仍使用 Affymetrix 寡聚核苷酸芯片，如小麦基因芯片覆盖的基因更广，重复性和稳定性更好。这里表述的许多方法，同样适用于寡聚核苷酸芯片系统，如 RNA 样品制备，也包含了特异的 GeneChip 表达分析。

2. 材料

2.1　植物材料

（1）常规品系：L88-31［9］、L88-18［9］和品种 Candenza（B1084-0-1）［5］。

（2）L88-31 背景的转基因面包小麦：纯合株系是从 B102-1-1 挑选的［6，7］。

（3）品种 Cadenza 背景的转基因面包小麦：无其他片段的转基因系 B1355-4-2（18）和整个质粒的转基因系 B1118-8-4（6）［5］。

2.2　植物生长条件

（1）密闭玻璃房或者人工气候室维持白天 18~20℃、黑夜 10~14℃，光周期 16 h/ 8 h，光照强度 750 mE/（s·m^2），相对湿度 50%~70%。

（2）自动控制的浇水系统。

2.3　SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（见［10］）

（1）分离胶缓冲液：1.25 mol/L Tris-borate，1%（*m/V*）SDS，pH 6.8（不需要调整）。

（2）浓缩缓冲液：1.0 mol/L Tris-HCl，pH 6.8，10%（*m/V*）SDS。

（3）10%（*m/V*）过硫氨酸（现配）。

（4）样品缓冲液：6.55 ml 浓缩缓冲液，pH 6.8，3.3%（*m/V*）SDS，10%（*m/V*）甘油和 1.54%（*m/V*）DTT（终浓度 100 mmol/L）。加水定容至 100 ml。

（5）电泳缓冲液：10×分离胶缓冲液。

（6）丙烯酰胺溶液：40%（*m/V*）丙烯酰胺和 2%（*m/V*）甲叉双丙烯酰胺。

2.4　总 RNA 提取（见注 2）

2.4.1　小麦胚乳总 RNA 提取（［11］）

（1）提取缓冲液：2%（*m/V*）CTAB，2%（*m/V*）PVP，100 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），25 mmol/L EDTA，2.0 mol/L NaCl（见注 3）。

（2）β-巯基乙醇（见注 4）。

（3）氯仿：异戊醇（24：1）（见注 4）。

（4）10 mol/L LiCl。

（5）SSTE 缓冲液：1.0 mol/L NaCl，0.5% SDS，10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），1 mmol/L EDTA。

2.4.2　小麦胚乳总 RNA 提取（［12］）

（1）匀浆缓冲液（见注5）：1.4%（*m/V*）SDS，0.1 mmol/L pH 8.0 乙酸钠，0.5 mol/L NaCl，0.05 mol/L EDTA（pH 8.0），0.1%（*m/V*）β-巯基乙醇。

（2）Tris-HCl（pH 8.0），溶解于酚/氯仿（1∶1，见注6）。

2.5　cDNA 芯片标记

（1）cDNA 合成：0.5 μg/μl（70 μmol/L）oligo（dT）$_{23}$ 锚定引物（Sigma-Genosis，Haverhill，UK），逆转录酶Ⅲ（200U/ml）和5×第一链合成缓冲液（Invitrogen，Paisley，UK），50×aa-dNTP 混合物（Sigma，10 μl dATP 100 mmol/L，10 μl dCTP 100 mmol/L，10 μl dGTP 100 mmol/L，5 μl dTTP 100 mmol/L，5 μl 氨基烯丙基标记的 dUTP 100 mmol/L）。

（2）aa-dUTP cDNA 纯化：微型洗脱柱（Qiagen，Crawley，UK），75%（*V/V*）乙醇。

（3）氨基烯丙基标记的第一链 cDNA：Alexa 染料琥珀酰亚胺酯（Alexa Fluor dye 555/647，Molecular Probes）备用（见注7），1 mol/L pH 9.0 $NaHCO_3$ 标记缓冲液，微型洗脱柱（Qiagen，Crawley，UK）。

2.6　芯片杂交和洗脱

（1）2×杂交混合液：400 ml 50%（*m/V*）甲酰胺，450 ml 10×SSC，16 ml 0.2%（*m/V*）SDS，2 mg/ml poly（dA）。

（2）洗脱室（50 ml Falcon 离心管）。

（3）溶液 A［2×SSC，1%（*m/V*）SDS，蒸馏水定容至 50 ml］，溶液 B［1×SSC，0.2%（*m/V*）SDS，蒸馏水定容至 50 ml］，溶液 C［0.1×SSC，0.2%（*m/V*）SDS，蒸馏水定容至 50 ml］。

2.7　实时逆转录 PCR

2.7.1　cDNA 合成

（1）SuperScript™ⅢRT and RNaseOUT®。

（2）2×RT-反应混合物（Invitrogen）：2.5 mmol/L oligo（dT）$_{20}$，2.5ng/ml 随机引物（6 碱基），10 mmol/L $MgCl_2$，dNTP。

2.7.2　实时逆转录 PCR 反应：配方

（1）SYBR Green Ⅰ染色液，Platinum *Taq* DNA 聚合酶（60 U/ml）。

（2）dNTP（400 mmol/L dGTP，400 mmol/L dATP，400 mmol/L dCTP，400 mmol/L dUTP）。

（3）40 mmol/L pH 8.4 Tris-HCl，100 mmol/L KCl，6 mmol/L $MgCl_2$。

（4）UDG（尿嘧啶 DNA 糖基化酶 40 U/ml）。

（5）ROX 参照染料（甘氨酸结合的 5-羧基-X-罗丹明，琥珀酰亚胺酯）。

3. 方法

3.1　芯片背景

我们使用了 19 846 个点，包含 9246 个 Unigene 序列的小麦 cDNA 芯片（http://www.cerealsdb.uk.net/index.htm）用于详细的转录组研究［3］。重复的 unigene 集合阵列点到了 Codelink 活化芯片上（Amersham Biosciences Ltd，UK）。

芯片杂交用与 aa-dUTP-cDNA 样品荧光标记染料反向的染料——Alexa 荧光染料 555 和 647。杂交在转基因系（B102-1-1、B1118-8-4 或 B1355-4-2）和其原始非转基因系（L88-31 或 Cadenza）之间的两个胚乳发育阶段（开花后 14 天和 28 天，dpa）和叶片（发芽后 8 天，dpg）成对比较［5］。每个材料取样 3 次，检测 2 次。

cDNA 芯片的优势是经济实惠，并允许使用者完全控制内容和设计（定制芯片）。相反，Affymetrix 寡核苷酸芯片更加灵活，它是单染料系统，使试验更简单、更特异（提高对类似的异构体和多基因家族成员的识别能力），提供更量化和易比较的数据。GeneChip® 基因组芯片，采用了一套能匹配任何转录序列的 25 碱基寡核苷酸“探针”。以小麦芯片为例，每组探针有 11 个，多数与组装的序列表达标签（EST）的公共保守域序列一致。因此，在 cDNA 芯片中，每一组探针对应的是许多 EST，而不是单个的 EST。为了识别不同的转录本，同时满足其他条件，如 GC 含量相对一致，探针通过程序自动化设计。对于一个目标转录本，设计了一个完全匹配的探针（perfect matches，PM）、一个单碱基错配探针（mismatches，MM），这样能对非特异杂交有一个估计和矫正。然而，对于 MM 探针的真正信号值存在争论，许多广泛使用的分析方法不用 MM 探针（见 3.10 节）。短探针（如 25-mer）对于序列相似的转录本更有效，因为单个碱基错配足够使杂交不稳定，而且固定长度使得杂交条件可以标准化，以满足所有探针；相反，较长的可变长度的探针，比如那些 cDNA 芯片平台使用的探针，将不可避免与任何与其部分序列相似性探针杂交，所以其真实信号集成了几个不同的转录分子。

3.2　植物材料和生长条件

转录组比较研究使用了三个六倍体转基因面包小麦（*Triticum aestivum*）的胚乳和叶片。转基因小麦品系 B102-1-1（L88-31 背景）［6，7］和 B1118-8-4（Cadenz 背景）［5］由基因枪共转化两个质粒产生［14］。一个质粒是 p1Ax1 质粒［13］，含有由自身的胚乳特异启动子驱动的高分子质量谷蛋白亚基 1AX1（*Glu-1Ax*）基因；另一个质粒含有选择基因 *bar* 和标记基因 *uidA*，由玉米泛素启动子驱动。转基因系 B1355-4-2［5］也来自 Cadenza，共转化获得只含 *1AX1* 基因和 *bar* 基因编码序列的“干净”片段。一个常规育种系 L88-18［9］是 L88-31 的姐妹系，也用于转录组比较。两个常规育种系（L88-31、L88-18）和转基因系（B102-1-1）的转录组两两比较是：B102-1-1 与 L88-31、L88-18 与 L88-31、B102-1-1 与 L88-18。转化方法的比较，即“干净”片段与整个质粒

的比较：B1355-4-2 与 Cadenza、B1118-8-4 与 Cadenza、B1355-4-2 与 B1118-8-4。本研究所用的不同面包小麦携带的相关基因成分的详细信息见表 15. 1。

表 15. 1　本研究所用的不同小麦系携带的相关基因成分。本表数据参考 Lawrence 等［9］、Barro 等［6］和 Rooke 等［7］的文章。HMW，高分子质量（high molecular weight）

品系	特征	内源 HMW 亚基基因	HMW 亚基转基因	标记基因
L88-31	亲本。L88-6 的姐妹系，来自同一次杂交	*1A* null，*1Bx17*，*1By18*，*1D* null	无	无
L88-18	对照系，L88-6 和 L88-31 的姐妹系，来自同一次杂交	*1Ax1*，*1Bx17*，*1By18*，*1D* null	无	无
B102-1-1	转基因系，L88-31 转入 *1Ax1* 基因和整个质粒	*1A* null，*1Bx17*，*1By18*，*1D* null	*1Ax1*	*bar*，*uidA*
Cadenze	商业品种	*1A* null，*1Bx14*，*1By15*，*1Dx5*，*1Dy10*	无	无
B13554-4-2	Cadenze 转入 *1Ax1* 基因和干净片段	*1A* null，*1Bx14*，*1By15*，*1Dx5*，*1Dy10*	*1Ax1*	*bar*
B1118-8-4	Cadenze 转入 *1Ax1* 基因和整个质粒	*1A* null，*1Bx14*，*1By15*，*1Dx5*，*1Dy10*	*1Ax1*	*bar*，*uidA*

（1）植物种在平衡行列设计的盆钵中，每个处理（小麦生长发育阶段）有 3 个生物学重复。

（2）开花后 14 天和 28 天胚乳，取样的植物每盆种 2 株。每一株只保留 2 个分蘖。选中的盆钵（本试验为 3 个生物学重复）包括用于发芽后第 8 天取叶片的第三株植物。

（3）每天观察穗，一旦发现中央小穗开花就做标记。

（4）在无菌条件下，手工从颖果剥离种子胚乳；每盆只从 2 个穗子的中部分别取至少 24 枚胚乳为一个样品。

（5）样品都是一天中同一时间取样，以避免昼夜节律的影响。

3. 3　SDS-PAGE

通过谷粒总蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳，检测所有小麦系的高分子质量亚基蛋白的表达（图 15. 1），使用 10%（*m/V*）丙烯酰胺凝胶和 Tris-硼酸缓冲液系统［10］。

3. 4　RNA 提取

3. 4. 1　小麦胚乳总 RNA 提取

提取方法根据 Chang 等［11］改编而来。

（1）用预冷的研钵和杵（-70℃）在液氮里将 2~3 g 组织磨成粉末（见注 8）。

（2）室温下迅速将磨碎组织转移到有 15 ml 提取缓冲液（加入 300 μl β-巯基乙醇）

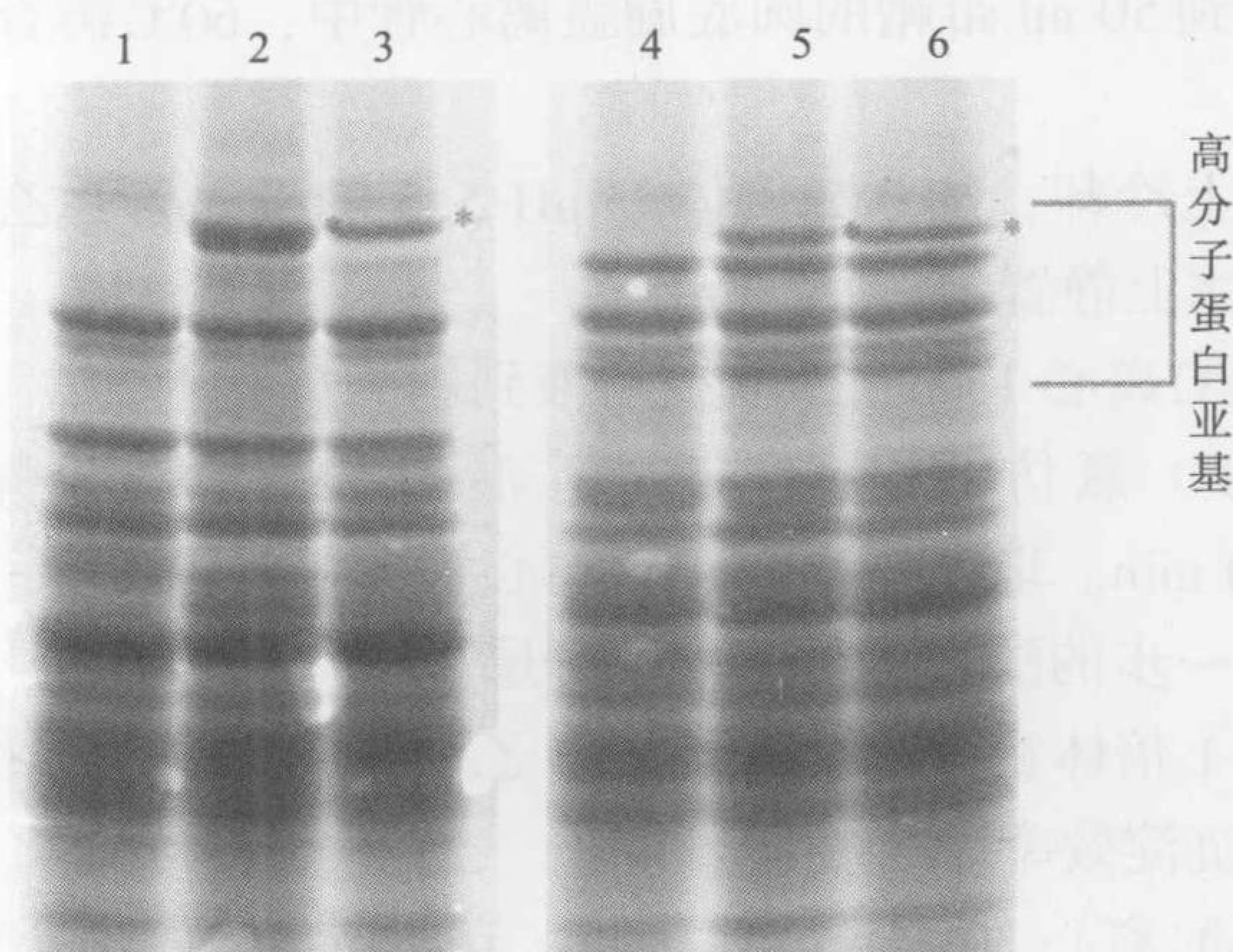


图 15.1　转录组研究用的面包小麦的高分子质量谷蛋白亚基 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。泳道 1：非转基因背景系 L88-31；泳道 2：转基因系 B102-1；泳道 3：常规育种系 L88-18（88-31 的姐妹系）；泳道 4：非转基因背景系 Cadenza（B1084）；泳道 5："干净"片段系（B1355）；泳道 6：整个质粒转基因系（B1118）。高分子质量谷蛋白亚基在方括号范围中，1Ax1 蛋白在不同小麦系（泳道 2、5、6 的转基因系和泳道 3 的常规育种系）的位置用星号（*）标注。数据来自 Baudo 等［5］

的离心管中，充分颠倒混匀（见注 9）。

（3）用等体积氯仿：异戊醇（终体积 15 ml）抽提两次，液相分离用 15 000 *g* 室温离心 10 min。

（4）上清液加 0.25 倍体积 10 mol/L LiCl 混匀。4℃过夜沉淀 RNA，4℃、15 000 *g*，离心 20 min 获取 RNA。

（5）500 ml SSTE 悬浮沉淀颗粒。

（6）用等体积氯仿：异戊醇抽提一次。

（7）上清液加两倍体积乙醇，−70℃沉淀 30 min 以上或者−20℃沉淀 2 h。

（8）15 000 *g* 离心 20 min 沉淀 RNA。

（9）75% 乙醇洗涤。

（10）干燥沉淀并溶解于无核酸降解酶水中。

3.4.2　发芽后 8 天幼苗 RNA 提取

提取方法根据 Cheng 等［12］改编而来。

（1）用预冷的研钵和杵（−70℃）加液氮里将已知质量组织（大约 1 g 幼叶）磨成粉末（见注 9）。

（2）将冷冻的粉末快速转移到第二个有 10～15 ml 匀浆缓冲液的研钵中（见注 10），继续研磨至均匀（见注 11）。

（3）匀浆液转移到 50 ml 带帽的圆底旋盖离心管中，60℃孵育 10 min（匀浆液终体积 5~10 ml）。

（4）离心管置冰上冷却，加 0.2 倍体积 pH 5.5 的 5 mol/L 乙酸钾（见注 12），轻轻地充分混匀，然后冰上静置 10~15 min

（5）10 000 *g*、4℃离心 15 min，取上清液到新的离心管中。

（6）加等体积酚：氯仿（1：1，*V/V*）混匀，拧紧瓶盖并剧烈振荡 10 min。10 000 *g*、21℃离心 10 min。取上层水相于新离心管中（见注 13）。

（7）水相重复上一步的酚：氯仿萃取和分层。

（8）往水相加 0.1 倍体积 3 mol/L pH 5.3 乙酸钠和 2.5 倍体积乙醇。混匀后-20℃孵育过夜以提高核酸沉淀效率。

（9）10 000 *g*、4℃离心 30 min 沉淀核酸，弃上清。倒置离心管数分钟。

（10）少量无核酸降解酶水（300~700 μl）溶解沉淀。核酸溶液转移到 Eppendorf 管，加 0.67 倍体积 10 mol/L 氯化锂沉淀 RNA。拌匀，冰上孵育 20~30 min（见注 14）。

（11）离心（15 000 *g*，室温，20 min）沉淀 RNA，弃上清。

（12）用尽可能小体积（200~300 μl）的无核酸酶水溶解沉淀，重复氯化锂沉淀，和上一步同样离心沉淀 RNA。

（13）200 μl 无核酸酶水溶解沉淀，加入 15 μl 5 mol/L 乙酸钾（pH 5.5）和 800 μl 乙醇。混匀，离心（15 000 *g*，室温，20 min）沉淀 RNA（见注 15）。

（14）弃上清，加入 1.0 ml 80%（*V/V*）乙醇，离心洗涤 RNA（15 000 *g*，室温，10 min）。

（15）离心管开盖置于超净工作台，室温干燥沉淀不超过 10 min。溶解于 100~200 μl无核酸酶水中。将每份样品分成等量小份以避免在反复冻融过程中污染或者降解。

3.4.3 总 RNA 样品除去基因组 DNA

RNA 提取之后用 DNA-free（DNA 酶处理和清除试剂盒，Ambion）按照使用说明处理 RNA 片段。该系统专为去除 RNA 样品中的 DNA 杂质和清除处理后的 DNA 降解酶Ⅰ，无需加热或苯酚提取。

3.4.4 RNA 定量分析和质量控制

RNA 浓度、完整性及质量检测使用 Nanodrop ND 1000 分光光度计（Labtech Int，UK）和 Agilent 2100 生物分析仪（RNA 6000 Nano Assay，Agilent Technologies，Palo Alto，CA，USA）（见注 16）。

3.4.5 样品保存

RNA 样品短期（最长 3 个月）保存在-20℃，长期则在-80℃。

3.5　cDNA 合成

（1）加 100 μg DNA 酶处理过的总 RNA（不超过 20 μl）、8 μl oligo（dT）$_{23}$锚定引物和无核酸酶水至终体积 28 μl。

（2）将启动反应混合物在 70℃孵育 10 min，置于冰上 5 min。

（3）向启动反应混合物加入 cDNA 合成反应混合物：10 μl 5×第一链缓冲液，10 μl 0.1 mol/L DTT，5 μl 50×aa-dNTP 混合物，2 μl Superscript 逆转录酶Ⅲ（200 U/L），加无核酸酶水至终体积 50 μl。

（4）42℃孵育 2~3 h。

（5）用微型离心柱（Qiagen）参照使用说明纯化 aa-dUTP-cDNA 产物。

（6）收集最后的洗脱液 10 μl 作为样品。cDNA 的产品将用于准备芯片杂交的探针和实时 RT-PCR 技术。最后反应可不用 50×aa-dNTP 混合物进行（见注 17）。

3.6　cDNA 芯片标记

（1）为了 cDNA 与荧光染料偶联反应，将需要反向染料标记的总 cDNA（见第 3.5 节步骤 6）分成两等份（5 μl），并将不同染料的反应放在单独的管。

（2）每管加入：5 μl 氨基烯丙基纯化的 cDNA（见 3.5 节步骤 3），3 μl 1 mol/L $NaHCO_3$ 标记缓冲液，2 μl ALexa 荧光染料 555 或者 647，10 ml 无核酸酶水。

（3）移液器混匀，室温黑暗孵育 1 h。

（4）用 mini Elute columns 试剂盒（Qiagen）去除没有与 aa-dUTP-cDNA 偶联的染料（见注 18）。

3.7　cDNA 芯片杂交

（1）取 20 μl 混合的标记 cDNA（来自 3.6 节步骤 6 的两个 Alexa 染料）加入到 25 μl 2×杂交缓冲液和 2 ml poly（dA）。

（2）探针在 95℃ 3 min 变性。

（3）标记的探针涂在盖片上，并将载片印有 Code Link 面朝下放置。

（4）将芯片杂交盒置于烘箱内 42℃过夜。

（5）将芯片置于含有溶液 A 的 Falcon 管（蓝帽）中（见 2.6 节步骤 2），室温颠倒 15 min（见注 19）。

（6）将芯片转移到第二个含有溶液 A 的 Falcon 管中，室温颠倒 15 min。

（7）将芯片转移到第三个含有溶液 B 的 Falcon 管中（见 2.6 节步骤 3），室温颠倒 15 min。

（8）将芯片转移到第四个含有溶液 C 的 Falcon 管中（见 2.6 节步骤 3），室温颠倒 15 min。

（9）将芯片放置干燥的 Falcon 管中，立刻 8000 *g* 离心干燥。

（10）用 Axon 仪器公司的 Gene-Pix 400B 型双激光扫描仪扫描杂交芯片。

3.8　cDNA 芯片数据分析

芯片做图像分析，检测每一个观测点的两种荧光信号的强度，以此来评估成对小麦系之间转录基因的表达差异。数据标准化后，作适合某个模型的统计分析，说明实验设计，检测差异表达的显著性。

3.8.1　图像分析和标准化

芯片上的点用 GenePix 软件扫描成图像（Gene Pix 第 5 版，美国 Axon 仪器公司），然后所有的点进行人工检测，排除杂交失败或者信号弱的。图像分析给出了每一点的所有像素，这些数据包含了两种荧光染料信号（647 和 555）的平均值和 Log_2 比率值。这些数据专用于差异表达分析。将数据从 GenePix 导入 GeneSpring 软件包（GeneSpring 6.2 美国硅遗传公司），然后信号强度的 Log_2 比率值进行标准化。本研究中，一个点的 Log_2 比率值（差异表达的）（M）和 Log_2 乘积（亮度的）（A）之间的比较表明，局部加权光滑描点技术（LOWESS）标准化处理，可用于消除数据不佳的趋势。换句话说，所有点的 Log_2 比率值乘以（across）光强（Log 乘积）应该在一个恒定范围内，但图像显示有一些会随着 A 增加而发生变化的趋势。因此，标准化处理的目的是消除 Log_2 比率数据的系统变异（比如由于实验过程）。局部加权光滑描点技术（LOWESS）标准化处理，是通过逐点检测 M 和 A 值之间的关系，然后相应地调整 M 值（adjusted M = M-LOWESS-fitted M）。由于有两个独立的实验，L88-31、L88-18 和 B102-1-1 的数据与 Cadenza 的数据分开处理。

3.8.2　统计分析

参考 Kerr［15］讨论的方法，使用 GenStat 统计系统（GenStat 第 7 版，GenStat Procedure Library Release PL15，Lawes Agricultural Trust，Rothamsted Research，Harpenden，UK）分析规范化的数据（进一步的详细信息见［5］及其补充材料）。在估计基因的固定效应之前，用符合 Log_2 比率的线性混合模型来估算实验设计（生物学和技术重复）的随机效应。该模型通过模型计算用数据的整体残差（噪声）估计标准误参数（一个基因一个参数）。每个参数对其标准误的比率服从残留自由度的 t 统计分布，这使得从 0（Log_2 范围）开始的差异表达统计上显著性得到评估。在我们的研究中，通过表达量和拷贝数筛选显著差异表达基因（$P<0.05$），只有那些表达差异大于 1.5 倍并且存在≥2 次以上重复的基因被保留下来做进一步分析。

3.8.3　用实时 RT-qPCR 验证差异表达

挑选转录本做实时 RT-qPCR 验证芯片表达数据，见 3.13 节。

3.9　芯片数据介绍

对简单的实质等同性实验来说，一个比较转基因系与对照之间基因表达的散点图就已足够了。文献［5］中参与两个实验的样品都标注在图 15.2 中。结果用 GeneSpring

软件包显示，绘制了每组比较小麦系之间每个基因成对的平均强度，并突出显示少数感兴趣的基因（统计上显著差异表达）。结果也在表 15.2 中作了数值化总结。

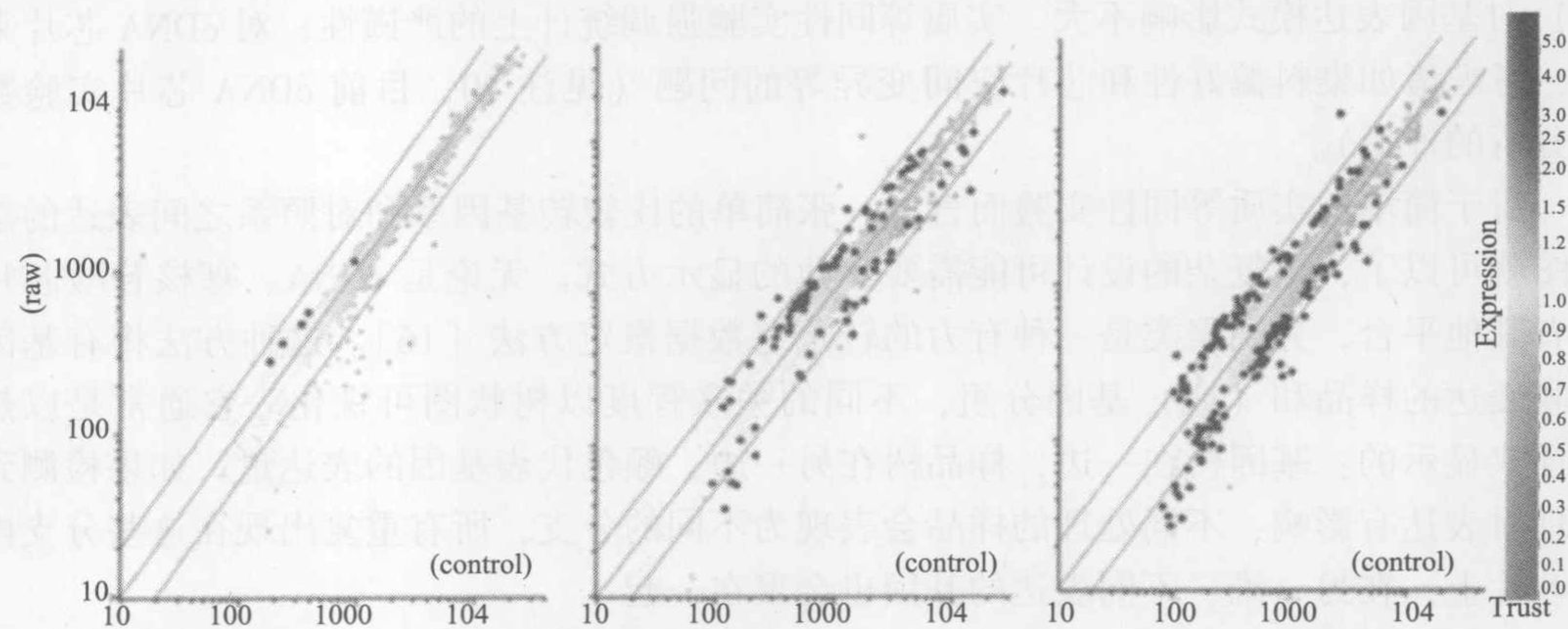


图 15.2　开花后 14 天胚乳转录组成对比较散点图：转基因系 B102-1-1 与对照系 L88-31（左），常规育种系 L88-18 与对照系 L88-31（中间），转基因系 B102-1-1 与常规育种系 L88-18（右）。散点图展示了不同面包小麦品系 L88-31、L88-18 和 B102-1-1 之间的开花 14 天胚乳组织转录组成对比较分析后得到数据的可视化结果。圆点代表了芯片上转录比较的基因的标准化的相对表达水平。黑色标示的圆点代表统计上显著差异表达大于 1.5 倍的基因（DEG）。每个图中的内线代表没有表达差异，两条外线代表 2.0 倍差异表达边界。黑白条（图右边）显示基因表达水平差异程度和数据信任量表，其中的纵轴代表相对表达水平（倍变化表示）：白色浅灰色色调代表表达无显著性变化，灰色下调，暗灰色到黑色过表达。横轴表示数据可以信任的程度：黑暗或者未饱和的色调代表低信任度，明亮或饱和的色调代表的高信任度。数据来自 Baudo 等 [5]

表 15.2　本研究中各个转基因面包小麦和对照组（非转基因的）之间成对比较得到的统计上显著差异表达基因的数量。本表展示了不同转录组比较表达在 1.5 倍以上统计上显著差异的基因数量和比例。数据来自 Baudo 等 [5]

比较品种		开花 14 天胚乳		开花 28 天胚乳		发芽 8 天叶片	
		No	%	No	%	No	%
1Ax1 转基因系（B102-1-1）	没有转 *1Ax1* 基因对照系（L88-31）	5	0.05	2	0.02	6	0.06
没有转 *1Ax1* 基因对照系（L88-31）	有内源 *1Ax1* 基因对照系（L88-18）	92	0.99	527	0.59	26	0.27
1Ax1 转基因系（B102-1-1）	有内源 *1Ax1* 基因对照系（L88-18）	154	1.63	118	1.25	4	0.04
1Ax1 干净片段转基因系（B13554）	非转基因对照系（Cadenza）	6	0.06	9	0.1	1	0.01
1Ax1 整个质粒转基因系（B1118）	非转基因对照系（Cadenza）	97	0.07	12	0.13	2	0.02
1Ax1 干净片段转基因系（B13554）	1Ax1 整个质粒转基因系（B1118）	26	0.28	4	0.04	3	0.03

结果表明，转基因并未影响显著数量的内源性基因的表达，转基因植物实质等同于其相应的非转基因对照或亲本［5］。结果也证实了转化方法（如干净片段或者整个质粒）对基因表达模式影响不大。实质等同性实验强调统计上的严谨性，对 cDNA 芯片来说，考虑诸如染料偏好性和芯片空间变异等的问题（见注 20，目前 cDNA 芯片实验数据分析的评价）。

对于简单的实质等同性实验而言，一张简单的比较转基因系和对照系之间表达的散点图就可以了，更复杂的设计可能需要其他的显示方式。无论是 cDNA、寡核苷酸芯片或者其他平台，分层聚类是一种有力的转录组数据概览方法［16］。这种方法将有基因关联表达的样品和（或）基因分组，不同的关联程度以树状图可视化。它通常是以热图样式显示的：基因树在一边，样品树在另一边，颜色代表基因的表达量。如果检测到处理对表达有影响，不同处理的样品会表现为不同的分支，所有重复出现在这些分支内的叶片上；在另一维，不同表达的基因也会聚在一起。

基因表达谱的非分层聚类方法，如 K 均值、质量阈值（QT）和自组织映射等也是常用到的。基因簇的平均表达值可以简化转录组数据。共表达意味着共同的转录调控和潜在的功能关系。进一步检查基因簇内基因，以确定是否有任何共同的已知功能（如蛋白质储存、应激反应或防御），或参与共同途径。对于作物如小麦中的绝大多数基因，功能只可能从序列相似性推测。聚类分析，显示和注释工具可以在开放资源［如 Bioconductor（http://www.bioconductor.org/）］和商业软件包［如 GeneSpring（Agilent Technologies，Inc）］获得。

3.10　分析小麦基因芯片背景

这里概述了 Affymetrix 基因芯片表达分析应遵循的步骤。详细的标准流程可以在“Affymetrix 基因表达分析技术手册”中查询（见注 21）。

基因芯片®探针芯片是由 Affymetrix 公司制造的（见注 22）。现在许多大学和私人公司已全面配备 Affymetrix Gene Chip TM®芯片平台，为客户提供各种芯片检测过程服务（GeneChip®芯片探针购买、cDNA 标记、芯片杂交、扫描、芯片分析等）。

Affymetrix Wheat Gene Chip®芯片由 AffymetrixGene Chip® Consortia Program 制造，包含了 61 127 套探针，代表小麦基因组所有 42 条染色体上 55 052 个转录本。芯片是基于 GenBank 和 dbEST（http://www.affymetrix.com/community /research/consortia.affx）上发表的功能域数据设计的。小麦基因组芯片可用于不同小麦种的基因表达研究：*T. aestivum*（UniGene Build ~38，2004.4.24），*T. tauschii*，*T. monococcum*，*T. turgidum*，*T. turgidum* ssp. *durum*。该芯片包含了至 2004 年 5 月，所有这些种的 EST 和全长序列设计的探针。

GeneChip®探针芯片制造过程结合了光刻和化学合成技术。1.7 cm^2 的芯片上有几万到几十万个不同的寡核苷酸探针，每个探针点（探针室）20 mm。每一个目标转录组由一套长度 25 个碱基的 11 个 PM 和 11 个 MM 探针来检测。这些 PM 和 MM 探针（探针对）位置彼此相邻。基因表达水平可以用 Affymetrix 软件通过 PM 和 MM 探针之间亮度差异来计算（见注 22），或者只用 PM 探针的亮度计算（RMA 和 gcRMA 分析）。

3.11 小麦基因芯片表达分析

3.11.1 RNA 样品准备

对于特定组织，RNA［总 RNA 或者提纯的 poly（RNA species）］提取和纯化可以采用已有的步骤（步骤与 3.4 节叙述的类似）。RNA 提取也有许多商业试剂盒可供选择。例如，TRIZOL-Reagent®（Invitrogen，见注 23）被推荐为小麦旗叶的总 RNA 提取方法。当提取物含有大量的糖蛋白和多糖时，标准步骤中匀浆（TRIZOL RNA 提取说明步骤 1）和 RNA 沉淀（TRIZOL RNA 提取说明步骤 3）需要略作修改。匀浆这一步，匀浆产物需要增加一步离心（见注 24）。RNA 沉淀这一步，水相回收沉淀总 RNA 需要用异丙醇和高盐沉淀溶液（见注 25）。为了得到高纯度 RNA（特别是 A_{260}/A_{230} 比值>1.8），我们还建议 RNA 过 RNeasy 柱（Qiagen，见注 26）洗涤。RNA 清理建议放在总 RNA 样品中去除基因组 DNA 之后进行（见 3.4 节）。核酸浓度和质量分别用 Nanodrop ND 1000 分光光度计和 Aglient 2100 生物分析仪（RNA 6000 Nano Assay，Agilent Technologies，Palo Alto，CA，USA）检测（见注 16）。

3.11.2 cDNA 合成和标记（见注 27）

从总 RNA［或者纯化的 poly（A）RNA］合成双链 cDNA，然后生物素标记的 cRNA 由 cDNA 体外转录。与基因探针芯片杂交前，发现 cRNA 片段对于最高灵敏度是很关键的。

3.11.3 杂交（见注 28）

准备杂交混合物包括 cRNA 片段和探针芯片对照。与探针芯片杂交，孵育 16h。

3.11.4 探针芯片洗脱与染色

（1）流体工作站（fluidic station）的设置：流体工作站是用于芯片洗脱和染色的。它是通过兼容 PC 工作站上 GeneChip® Operating System（GCOS）/Microarray Suite 操作的。步骤包括设置和启动流体工作站（见注 29 和注 30）。

（2）芯片的洗涤和染色（见注 31）：16 h 杂交后，除去芯片上杂交液（见注 28），然后将芯片完全浸入适当体积推荐的清洗液（见注 31）。

3.11.5 芯片扫描（见注 31）

一旦扫描结束，每张完整的芯片图保存在一个以 . dat 为扩展名、实验名字命名的文件。GCOS 采集和分析芯片图谱及实验数据：定义探针单元并计算每个单元的光强度（见注 22）。由于制造过程中的更高的质量控制，许多 cDNA 芯片图谱分析的问题，如空间变异对 Affymerix 芯片来说不用考虑（3.8 节）。产生了包含每一个 PM 和 MM 探针信号值的输出文件（cel 文件）。

3.12 小麦基因芯片数据分析

Affymetrix 公司芯片广泛用于许多种生物，人们投入了相当大的精力来开发和测试不同的方法分析信号，以寻找最好的基因表达检测方法。Affymetrix 开发的方法是以一组探针的 PM 和 MM 之间的平均差异来估计表达（MAS5）。然而，MM 信号值的有效性还有疑问，而且有一些替代的方法看起来事实上超过了 MAS5。RMA（robust multichip average）算法取一个实验的所有 PM 数据（如全部 cel 文件），不仅标准化每个芯片表达数据中位数，而且对每个芯片表达数据使用相同的方差［17］。gcRNA 算法是 RMA 一个变种，它将每个探针的 GC 组成对信号贡献的权重考虑在内［18］。与其他方法相比，在标样［19］检测和实时反转录 PCR 定量［20］方面，它能很好处理 Affymetrix 芯片数据。gcRNA 算法可以使用开源的 Bioconductor 软件包（http://www.bioconductor.org）或者商业软件如 GeneSpring® 7（Agilent Technologies, Inc）。

一旦选择了表达检测方法（如 MAS5、RMA、gcRNA 或者其他），接下来的分析是一样的，而非标准化数据（如 MAS5）必须首先进行标准化（如除以每一个芯片表达值的中位数）。建议先筛选探针集，保留绝对表达值高于阈值（至少一个样品如此）的所有探针（可以从芯片中非小麦对照的信号判断）。这些探针进一步筛选那些表达差异在任何一对样品的阈值之上的；通常 1.4 倍的变化被认为是可以检测到的最小值。实质等同性实验设计通常有 2 个以上基因型，至少 3 次生物学重复。为了检测到基因型之间统计上显著差异表达的基因，对每个探针集的表达值的对数（它们通常呈对数正态分布）作方差分析（ANOVA）。假定即使经过筛选，探针数量依然非常大，可以用多重检验校正。Benjamini-Hochberg 假阳性率（FDR）校正［21］是不错的选择。对许多探针做经典的 $P<0.05$ 的方差分析和 Benjamini-Hochberg 多重检验校正，能够有大约 5% 的基因通过纯属偶然。然而，如果很少或根本没有基因通过此校正，可以取消多重检测，方差结果是假阳性率所致。例如，如果 1000 个探针 $P<0.05$ 测验，50 通过了但没有多重检验校正，这只是不超过预计的运气。重要基因名单的实质等同性标准是与 cDNA 芯片实验相同的［5］。

3.13 实时 RT-PCR 验证转录组数据

有两种常用的基因（扩增子）定量检测方法：基因特异荧光探针（如 TaqMan chemistry）或者特异双链 DNA 结合试剂（SYBR green chemistry）［22］。我们通过实时 RT-PCR，选择 SYBR green chemistry 来验证 cDNA 芯片发现的 DEG 的表达。不同的基因设计特异引物（见注 32）。

3.13.1 实时 RT-PCR 反应的准备

（1）PCR 用可视化的 96 孔板在 ABI® PRISMA 7500 Sequence Detection System 仪器上进行（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）。

（2）总 RNA（2μg 脱氧核糖核酸酶处理过的 RNA，来自 3.4 节）用反转录酶和缓冲液（SuperScript™ Ⅲ RT, Invitrogen）按照说明手册反转录。

（3）PCR 反应用 25 μl 体系：100 ng cDNA，12.5μl 2×带 SYBR 绿色荧光染料的 Platinum® qPCR Super Mix-UDG（Invitrogen），0.5 μl ROX 参照染料（Invitrogen），一对特异引物（每个引物 200 ng）（见注 33）。

（4）所有 PCR 反应用了如下标准温度控制：50℃ 2 min，95℃ 2 min，40 个循环：95℃ 15 s 和 60℃ 1 min（见注 34）。

3.13.2　实时 PCR 数据提取和分析

（1）原始数据提取。收集每个样品循环阈值（Ct）［23］。为了比较不同的 cDNA 样本的 Ct 值，所有比较基因的 Ct 值都根据看家基因 actin 进行标准化（见注释 35）。

（2）数据分析。使用 Pfaffl 推荐的方程式计算选择基因的相对表达量［24］。这些算法包括校正基因扩展效率。不同目标基因和参照基因的 PCR 扩增效率估计使用 Ramakers 等［25］推荐的方程式。

3.14　递交芯片数据到公共数据库：ArrayExpress

芯片的数据应存放在公共数据库。ArrayExpress［26］是在欧洲生物信息研究所（EBI）的高通量功能基因组数据的公共数据库。这个数据库由两部分组成：ArrayExpress 库（MIAME，主要是初级归档）和 ArrayExpress 数据库（它是不断注释的选择基因表达谱数据库）。ArrayExpress 是 MGED（基因芯片表达数据协会）推荐的三个公共芯片数据库之一。它以保密的形式存储文章使用的数据，允许获得授权的用户，如期刊编辑和审稿人登录数据，文章发表后与其相关的数据可以在指定日期公开。一般情况下，芯片数据提交包括 4 个主要步骤：①创建一个提交用的新账户（MX 账户）；②提交程序（芯片制备方案、样品的生长和提取步骤、样品标记、杂交，扫描、分析步骤等）；③提交芯片设计（名称、设计、技术等）；④提交实验（实验设计、发表的论文、样品、提取物等）。有关的详细信息请参阅网页：http://www.ebi.ac.uk/miamexpress/Help。

3.15　统计模型

剩余最大似然法（REML 法）［27］在 GenStat 第 7 版（2003 年）统计系统中应用，适合于混合模型（包括随机和固定效应），以从任何特定比较（如 14dpa 的 B102-1-1 与 L88-31）中，每个基因多达 6 个观察值，建立一套完整的数据集。根据模型偏差估算实验设计中由生物学重复和技术重复所组成的方差，不同的模型之间进行测试时，随自由度变化的其方差变化服从 χ^2 分布。使用 Wald 检验［28］评估模型中的固定效应，测试统计量也服从 χ^2 分布。因此，建模考虑了设计上的变异效应（随机效应）和固定效应（9246 个基因）。经过随机和固定参数（term）的显著性评估，在 14 dpa 的 B102-1-1 和 L88-31 比较模型是：

$$y_{ijk} = \text{BioRep}_i + (\text{BioRep} \times \text{TecbRep})_{ij} + \text{Gene}_k + \varepsilon_{ijk},$$

式中，y_{ijk}代表苗期 14 天的 B102-1-1 对 L88-31 基因表达量的对数值；BioRep_i 代表生物学重复，$i=1$，…，3；TechRep_j 代表技术重复，$j=1$，2（比如，染料置换：$j=1$ 是染料 555/染料 647 的比值，$j=2$ 代表染料 647/染料 555 的比值）；Gene_k 代表芯片的数值，

$k=1$，…，9246；ε_{ijkl}是错误项。为了匹配模型，GenStat 中所有选项都设置为因子（指标列）。BioRep×TechRep 表示两重复间的互作。生物学重复的主效再加上重复间的互作，表明随机模型中技术重复（如染料互换）是嵌套在生物学重复内之内的。因此，随机模型的公式与设计使用是匹配的。模型参数 Gene 包含的所有 9246 个基因的参数。基因的任何一个参数与其标准误的比值，转化为对数值时，构成了所有自由度下的模型 t 测验和基因 t 测验。这使任何被评估基因的表达差异可测定数据的显著性，如使用上述模型在 14dpa 时，比较 B102-1-1 与 L88-31 的对数值。三个材料/时间点的 L88-31 与 L88-18、B102-1-1 与 L88-18 之间的比较，采用了类似的模型统计。

对于三个 Cadenza 系，每三个一组实验材料/时间点（种子/14dpa 和 28dpa；叶片/8dpg）的数据集与所有三个比较数据建模：B1355-4-2［18］与 Cadenza，B1118-8-4［6］与 Cadenza 对照，B1118-8-4［6］与 B1355-4-2［18］，两个每一个基因的固定效应的指标变量来表示比较 B1355-4-2［18］与 B1118-8-4［6］的。经评估设计方面的意义，所有三种材料/时间点最好的模型是相同的：

$$y_{ijkl} = \text{Comparison}_i + (\text{Comparison} \times \text{BioRep})_{ij} + (\text{Comparison} \times \text{BioRep} \times \text{TecbRep})_{ijk} + (\text{Gene}_l \times \text{Cad1}) + (\text{Gene}_l \times (\text{Cad2}) + \varepsilon_{ijkl})$$

式中，y_{ijkl}代表比较对数值（B1355-4-2［18］与 Cadenza、B1118-8-4［6］与 Cadenza 对照，B1118-8-4［6］与 B1355-4-2［18］）；BioRep_i 代表生物学重复 j，$j=1$，2，3；技术重复 k，$k=1$，2（染料置换：染料 555/染料 647，染料 647/染料 555）；基因$_l$与 B1355-4-2［18］相比，$l=1$，…，9246。（Cad1）与 B1355-4-2［18］比较作为处理系（对数比率的分子）（Cad1=1），或者作为对照系（对数比率的分母）（Cad1=−1），或者不存在（Cad1=0），或者与 B1118-8-4（6）想比较 Cad2）作为处理系（对数比率的分目）（Cad2=−1），或者不存在（Cad2=0），错误项是 ε_{ijkl}，适合 $ijkl$。参数（terms）之间的点表示它们的相互作用，所以上面模型中的随机效应，生物学重复嵌套在比较中，而技术重复（染料交换）嵌套在生物学重复中。因此，这里再次发现最好的模型随机部分形式，涉及直观的 Cadenza 研究中所使用的设计。此外，由于所用的模型，即固定部分与指标变量，任何一个超过所有的比较基因所产生的额外的信息，特别是比较效益的基因测试每个基因的三个测试使用了相同的整体残差。

4. 注释

注 1：数据提交。这里展示的基因表达数据已经递交到 ArrayExpress 数据库（http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/Submissions/index.html），记录号是 A-MEXP-177。

注 2：除非另有说明，所有的化学溶液应是无核酸酶的。

注 3：提取液最好在室温下保存。高压灭菌后的提取液应该加入 0.5 g/L 亚精胺。β-巯基乙醇应该现配，加到分装的缓冲液。

注 4：使用试剂应谨慎，有毒、易燃或刺激性的试剂应在通风橱操作。

注 5：匀浆缓冲液应在使用前用各组分浓缩储存液现配。

注 6：pH 8.0 Tris-HCl 缓冲的苯酚：氯仿（1：1）的配制：将 800 ml 10 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl，小心加到 400 g 超纯的苯酚晶体和 0.4 g 8-羟基喹啉（抗氧化剂）中。混合搅拌 1~2 h，然后静置分离。弃上层水相，下层黄色酚：氯仿层留用。如果保持黑暗，可以在室温下稳定的保存 1~2 个月。

注 7：将一小瓶 Alexa 染料溶于 2 ml 的二甲基亚砜（DMSO）。

注 8：用前将研钵、杵、药匙放入液氮中预冷并保持。

注 9：15 ml 提取液加 300 μl β-巯基乙醇置于 65℃水浴加热。

注 10：准备第二套研钵、杵和一份缓冲液用于室温下匀浆。

注 11：如果匀浆太黏，多加些缓冲液（1~2 ml）。

注 12：加入乙酸钾（pH 5.5）沉淀 K^+-SDS/蛋白质/基因组 DNA/糖类的复合物。

注 13：要小心，保留的水层不要被沉淀、界面、变性蛋白质层的物质所污染。

注 14：氯化锂沉淀 RNA 的效率取决于核酸浓度，当 RNA 浓度降到 100mg/ml 以下时，沉淀效率会突然显著性地下降。

注 15：用钾离子置换与纯化的 RNA 结合的残留锂离子。

注 16：对于纯化很好的 RNA，A_{260}/A_{280} 比值应为 2.0 左右，A_{260}/A_{230} 比值应>1.8。浓度和纯度可以用 NanoDrop ND1000 分光光度计和 Agilent 2100 生物分析仪检测（http://www.agilent.com）。

注 17：另外，用于实时相对定量 RT-PCR 的 cDNA 可以用 SuperScript Ⅲ RT 和去 RNA 酶试剂盒（Invitrogen），参照说明书合成。

注 18：AA-dUTP 标记 cDNA 洗涤，添加 10 μl 无核酸酶水于迷你洗脱柱膜的中心，保持 5 min，离心 5 min。

注 19：将芯片置于 50 ml 锥形离心管，锡箔纸包裹。

注 20：在我们的研究中，数据分析采用了 GeneStar 系统，因为 GeneSpring 不适合对单基因建模检测其显著性，它建立的是所有基因的整体模型而不是基于基因对基因的。许多研究中数据标准化采用 GeneSpring 最方便。然而，由于我们的研究，进一步发展了 GeneStar 统计系统（第 8 章和第 9 章），允许用更复杂的方法对芯片数据建模。图像分析后的数据现在可以更简单地导入 GenStat，然后标准化和进一步地分析。而且，后续的和正在进行的研究表明不同的建模技术可以用于计算芯片上某区域点的空间变异［29，30］。另外，对标准化表达值层次混合建模［31，32］可以处理复杂变异数据，同时还能有功效检测到观测值少的基因的差异表达。最后，基因芯片的多重激光扫描分析［33］以及函数回归建模可能使得激光扫描高表达基因的噪声水平降低。

注 21：使用在这里讨论的建模方法检测了大量的基因，用拟合混合分布的基因 P 值来调查显著基因的假阳性率的方法［34］应该很有用，现在整合成了 GenStat 的 FDRMIXTURE 组件。最后，有少量数据点每一个检测了大量基因的问题通过使用方差收缩的方法［35］可以得到缓解。这里使用了基因方差估计的检测方法，保留了基因特异性，又包含了基因之间的信息。这比单个基因检测更强大，但避免使用所有基因共同的最根本差异假设导致的假阳性率问题（与这里建模描述的那样）。

注 22：实验方案可以从网页下载：http://www.affymetrix.com/support/technical/

manual/netaffx_ MAGE_ ML_ manual. affx.

注 23：目前的技术参考见 http://www. affymetrix. com。一张芯片上有多达 130 万不同的寡核苷酸“探针”（探针是芯片上合成的标准的 25 bp 寡核苷酸序列，可以在溶液中捕获互补目标）。每一个探针定位于特别的区域，称为“探针单元”。每个探针单元格中包含一个给定的核苷酸几十万到几百万之间的拷贝。“探针对”指的是 Affymetrix 芯片上基本的检测单元，由一对完美匹配（PM）和相应错配（MM）的探针组成。芯片上一组探针对（“探针对”）代表选定的表达序列。

注 24：TRIZOL-Reagent®，Invitrogen 目录编号 15596-026。

注 25：按照 TRIZOL-Reagent® RNA 提取步骤 1 匀浆，12 000 *g* 离心 10 min 去除匀浆中的不溶性物质。

注 26：每 1 ml TRIZOL 试剂，水相中要依次加 0. 25 ml 异丙醇（Sigma）和 0. 25 ml 高盐沉淀溶液（0. 8 mol/L 柠檬酸钠和 1. 2 mol/L NaCl）来沉淀总 RNA。

注 27：按照说明书用 RNeasy column（Qiagen）洗涤和浓缩总 RNA。

注 28：实验方案见基因芯片表达分析技术手册，第 1 章第 2 节。

注 29：实验方案见基因芯片表达分析技术手册，第 2 章第 2 节。

注 30：实验方案见基因芯片表达分析技术手册，第 3 章第 2 节第 7 部分。

注 31：参照基因芯片自动孵育装置用户操作指南。

注 32：实验方案见基因芯片表达分析技术手册（第 9 章第 2 节“探针清洗和染色”和第 15 章探针芯片扫描）。查看扫描仪用户手册的安全防范措施和详细信息。

注 33：用于 SYBR 绿色荧光信号检测和挑选芯片差异表达基因（DEG）定量验证的特异引物对都是用 Primer Express®软件（ABITM PRISMA）按照 TaqMan 探针和引物设计指南设计的（EST 克隆序列在 http://www. cerealsdb. uk. net/index. htm 检索）。

注 34：在分装到反应孔之前预先准备好主要混合物，包括足量的 cDNA 和反应成分，确保每一个反应含有等量 cDNA（即每个测试样品 3 次生物学重复，每个重复有 3 次技术重复），并可减少移液和其他错误。

注 35：为每一对特异性引物做解离曲线分析，检测是否有非特异性扩增发生。绘制了荧光信号（DR_n）对循环数呈指数增长的基线消减点图（baseline-subtracted plot），统计的多数基线数据的循环数为 3~15 个。

注 36：本研究中，内参基因 *Actin*（克隆号：H01_ P335_ plat_ 6；http://www. cerealsdb. uk. net/index. htm）在不同株系、组织和发育阶段的表达没有差异。

注 37：可用数据：http://www. ebi. ac. uk/arrayexpress。

致谢

洛桑研究所得到了英国生物技术和生物科学研究委员会（BBSRC）的基金资助。转录组研究受到了 BBRSC 的 Gene Flow Initiative（ref. GM 14152）项目的资助。作者感谢洛桑研究所的 Andrian Price 先生参与了芯片数据分析方法的讨论。我们也感谢同仁 Michael Holdsworth 教授（诺丁汉大学）、Keith Edwards（布里斯托大学）、Rebecca Lyons 女士和 Gabriela M. Pastori 博士（洛桑研究所）。

（鲍坚东　周　波　译）

参考文献

1. Evans, L. T. (1993) Crop Evolution, Adaptation and Yield. Cambridge University Press, Cambridge.
2. FAO/WHO (1996) Biotechnology and Food Safety, Report of a Joint FAO/WHO Consultation.
3. Wilson, I. D., Barker, G. L. A., Beswick, R. W., Shepherd, S. K., Lu, C., Coghill, J. A., Edwards, D., Owen, P., Lyons, R., Parker, J. S., Lenton, J. R., Holdsworth, M. J., Shewry, P. R. and Edwards, K. J. (2004) A transcriptomics resource for wheat functional genomics. *Plant Biotechnol. J.* 2, 495-506.
4. Wilson, I. D., Barker, G. L. A., Lu, C., Coghill, J. A., Beswick, R. W., Lenton, J. R. and Edwards, K. J. (2005) Alteration of the embryo transcriptome of hexaploid winter wheat (Triticum aestivum cv. *Mercia*) *during maturation and germination. Funct. Integ. Genomics* 5, 144-154.
5. Baudo, M. M., Lyons, R., Powers, S., Pastori, G. M., Edwards, K. J., Holdsworth, M. J. and Shewry, P. R. (2006) Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotechnol. J.* 4, 369-380.
6. Barro, F., Rooke, L., Békés, F., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R. J., Lazzeri, P., Shewry, P. R. and Barcelo, P. (1997) Transformation of wheat with HMW subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotechnol.* 15, 1295-1299.
7. Rooke, L., Steele, S. H., Barcelo, P., Shewry, P. R. and Lazzeri, P. (2003) Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. *Euphytica* 129, 301-309.
8. Shewry, P. R., Halford, N. G., Tatham, A. S., Popineau, Y., Lafiandra, D. and Belton, P. S. (2003) The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Adv. Food Nutr. Res.* 45, 221-302.
9. Lawrence, G. J., Macritchie, F. and Wrigley, C. W. (1998) Dough and baking quality of wheat lines in glutenin subunits controlled by Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 loci. *J. Cereal Sci.* 7, 109-112.
10. Shewry, P. R., Tatham, A. S. and Fido, R. J. (1995) Plant Gene Transfer and Expression Protocols: Separation of Plant Proteins by Electrophoresis, Vol. 49. Humana, Totowa.
11. Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. A. (1993) Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113-116.
12. Cheng, G. P., Wilson, I. D., Kim, S. H. and Grierson, D. (2001) Inhibiting expression of a tomato ripening-associated membrane protein increases organic acids and reduces sugar levels of fruit. *Planta* 212, 799-807.
13. Halford, N. G., Field, J. M., Blair, H., Urwin, P., Moore, K., Robert, L., Thompson, R., Flavell, R. B., Tatham, A. S. and Shewry, P. R. (1992) Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (Triticum aestivum L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theor. Appl. Genet.* 83, 373-378.
14. Christensen, A. H. and Quail, P. H. (1996) Ubiquitin promotor-based vectors for high-level expression of selectable and/or screen-able marker genes in monocotyledonous plants. *Transgen. Res.* 5, 213-218.
15. Kerr, M. K. (2003) Linear models for micro-array data analysis: hidden similarities and differences. *J. Comput. Biol.* 10, 891-901.
16. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *P. N. A. S. USA* 95, 14863-14868.
17. Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. and Speed,

T. P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.

18. Wu, Z. J., Irizarry, R. A., Gentleman, R., Martinez-Murillo, F. and Spencer, F. (2004) A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J. Am. Stat. Assoc.* 99, 909-917.
19. Choe, S. E., Boutros, M., Michelson, A. M., Church, G. M. and Halfon, M. S. (2005) Preferred analysis methods for Affymetrix GeneChips revealed by a wholly defined control dataset. Genome Biol. 6, Artn r16.
20. Qin, L. X., Beyer, R. P., Hudson, F. N., Linford, N. J., Morris, D. E. and Kerr, K. F. (2006) Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. Bioinformatics 7, Artn 23.
21. Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate-a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Stat. Soc. Ser. B-Methodological* 57, 289-300.
22. Bustin, S. A. (2004) A-Z of Quantitative PCR: Quantification Strategies in Real-Time PCR. IUL Biotechnology Series, Int. Univ. Line, La Jolla.
23. ABI-Prisma (2001) 7700 Sequence Detection System: Relative Quantification, Vol. 2.
24. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical method for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2003-2007.
25. Ramakers, C., Ruijter, J. M., Lekanne Deprez, R. H. and Moorman, A. F. M. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62-69.
26. Parkinson, H., Kapushesky, M., Shojatalab, M., Abeygunawardena, R., Coulson, R., Farne, A., Holloway, E., Kolesnykov, N., Lilja, P., Lukk, M., Mni, R., Rayner, T., Sharma, A., William, E., Sarkans, U. and Brazma, A. (2006) ArrayExpress- a public database of microarray experiments and gene expression profiles. Nucleic Acid Res. doi: 10. 1093/nar/gkl995.
27. Patterson, H. D., and Thompson, R. (1971). Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. *Biometrika* 58, 545-554.
28. Welham, S. J., and Thompson, R. (1997). Likelihood ratio tests for fixed model terms using residual maximum likelihood. *J. Royal Stat. Soc. Ser B* 59, 701-714.
29. Burgueö, J., Crossa, J., Grimanelli, D., Leblanc, O. and Autran, D. (2005) Spatial analysis of cDNA microarray experiments. *Crop Sci.* 45, 748-757.
30. Baird, D., Johnston, P. and Wilson, T. (2004) Normalisation of microarray data using a spatial mixed model analysis which includes splines. *Bioinformatics* 20, 3196-3205.
31. Smyth, G. K. (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3.
32. Newton, M. A., Noueiry, A., Sarkar, D. and Ahlquist, P. (2004) Detecting differential gene expression with a semiparametric hierarchical mixture method. *Biostatistics* 5, 155-176.
33. Khondoker, M. R., Glasbey, C. A. and Worton, B. J. (2006) Statistical estimation of gene expression using multiple laser scans of microarrays. *Bioinformatics* 22, 215-219.
34. Allison, D. B., Gadbury, G. L., Heo, M., Fernández, J. R., Lee, C. -K., Prolla, T. A. and Weindruch, R. (2002) A mixture model approach for the analysis of microarray gene data. Comput. *Stat. Data Anal.* 39, 1-20.
35. Cui, X., Gene-Hwang, J. T., Qui, J., Blades, N. J. and Churchill, G. A. (2003) Improved statistical tests for differential gene expression by shrinking variance components estimates. *Biostatistics* 6, 59-75.

第16章 实质等同性：蛋白质组学

Alison Lovegrove　Louise Salt　Peter R. Shewry

摘　要：小麦作为全球主要农作物之一，被加工成一系列食品供消费者消费。因此，确定转基因技术对小麦的影响（预期的和非预期的），以及转基因品系与常规育种品系是否实质等同，具有十分重要的意义。蛋白质组学分析是解决这些问题的途径之一。双向聚丙烯酰胺凝胶电泳（2D-PAGE）仍然是蛋白质组学研究中最广泛使用的方法，然而众所周知，它在不同实验室难以重复。因此本文介绍的是在我们实验室开发的分析小麦谷粒蛋白的标准操作程序，可确保双向电泳蛋白质组学研究的可重复性。

关键词：实质等同性，小麦，二维聚丙烯酰胺凝胶电泳（双向电泳），转基因，蛋白质组学，质谱分析

1. 引言

小麦一般是在加工成粮食产品后供人类消费，包括加工成烘焙食品（面包、蛋糕、甜点和饼干）、面条和意大利面，以及用来制备具有特殊功能性质的调料，因而人类接触更多的是面粉或加工品而非小麦谷粒。此外，很多小麦加工品具有强烈的文化和宗教意义，使得转基因小麦与其他转基因作物相比具有更多的情感成分。

因此，建立鉴定转基因小麦的常规程序及判断其与常规育种小麦的实质等同性［1］受到消费者和监管当局的关注［2］。已有一些方法可用于解决这一问题［3］，包括利用已完善的蛋白质组学分析小麦籽粒［4~7］。该方法也已应用于其他转基因作物以确定其实质等同性［8~10］。

由于蛋白质组成是动态的，取决于取样时的内外环境，因此对于任何供试细胞都无法确定其完整的蛋白质组。同时，不同蛋白质组分在数量上的巨大差异也使得鉴定和定量分析微量蛋白组分常难以实现。尽管如此，以小麦和其他谷类作物为材料的蛋白质组学研究已取得实质性进展。

在蛋白质组学研究中，双向电泳是分离蛋白质的传统方法，也是大多数小麦研究中仍旧使用的方法［4~7］，虽然目前不少实验室已应用二维液相色谱-质谱联用技术（2DLC-MS）替代双向电泳或与双向电泳并用。这两种技术互为补充，通常鉴定的是不同的蛋白质。然而，2DLC-MS 的费用限制了其在很多实验室的使用，因此双向电泳仍然是最广泛应用且容易获得的技术。固相 pH 梯度胶条的发展使得双向电泳对技术的要求大大降低，重复性大大提高。然而，双向电泳技术仍存在很多局限性，如难以分离膜蛋白、带高价电荷（碱性或酸性）蛋白和高分子质量蛋白。此外，当高丰度组分存在

时，低丰度蛋白难以鉴定。这一问题在小麦谷粒中尤为明显，若采用全蛋白提取法，主要储藏蛋白会掩盖很多其他蛋白质。但是，细胞分级分离或连续萃取法，或通过选用合适的限制性 pH 梯度，能在很大程度上克服这些问题。

以下描述的是基于包括我们实验室在内的若干实验室所采用的方法。

2. 材料

所有化学药品必须是高质量的，如果可能的话，用 AristaR 级。如无特别标明，供应商均为 Sigma、Poole、Dorset、UK。

2.1 提取缓冲液

（1）适用于白面粉：5 mmol/L 氨基丁三醇（Trizma base），1 mmol/L $CaCl_2$，不需调节 pH。

（2）总蛋白提取缓冲液：2 mol/L 硫脲（thiourea），7 mol/L 尿素（urea），1%（*m/V*）二硫苏糖醇（DTT），2%（*m/V*）CHAPS，0.5% IPG-缓冲液，pH 3~10（GE Healthcare，UK）。

（3）Osborne 分级缓冲液：水饱和正丁醇（50 ml 正丁醇加水 5ml，摇晃，静置分层，取上层），0.5 mol/L NaCl，70%（*V/V*）乙醇，50%（*V/V*）丙醇，2%（*V/V*）β-巯基乙醇，1%（*V/V*）冰醋酸；5%（*V/V*）冰醋酸。

（4）酸：丙酮沉淀缓冲液

溶液Ⅰ：含 10%（*m/V*）TCA、0.07%（*m/V*）DTT 的丙酮

提取蛋白前 1 天准备 10% TCA，用前在−20℃冰箱中至少储存 12 h。新鲜的 DTT 于使用当天加入。

溶液Ⅱ：含 0.07%（*m/V*）DTT 的丙酮

提取前 1 天将丙酮储藏于−20℃，用前至少储存 12 h。新鲜的 DTT 于使用当天加入。

使用后弃去配好的溶液，在随后的提取中配制新的溶液。

2.2 等电聚焦（IEF）

（1）水化液：7 mol/L 尿素（urea），2 mol/L 硫脲（thiourea），2%（*m/V*）CHAPS，40 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT），0.5% IPG 两性电解质（适宜 pH），痕量溴酚蓝。

（2）DryStrip™覆盖油（GE Healthcare，UK）。

（3）Immobiline DryStrips 干胶条（GE Healthcare，UK）。

（4）电极滤纸片（GE Healthcare，UK）。

（5）平衡液：50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8，6 mol/L 尿素，2%（*m/V*）SDS，30%（*V/V*）甘油，痕量溴酚蓝。将 1%（*m/V*）DTT 或 4%（*m/V*）碘乙酰胺（iodoacetamide）加到新鲜配制的平衡液中（还原和脲甲基化）。

2.3　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

（1）Tris-HCl（1.5 mol/L），pH 8.8。

（2）SDS（10%，*m/V*）。

（3）过硫酸铵（APS，10%，*m/V*）用前现配。

（4）*N*，*N*，*N'*，*N'*-四甲基乙二胺（TEMED）。

（5）水饱和正丁醇。

（6）“丙烯酰胺”储液：30% Duracryl（丙烯酰胺），0.65% Bis（甲叉双丙烯酰胺）（Proteomic Solutions，France）。

（7）底槽液：25 mmol/L Trizma base；0.015 mol/L 冰醋酸。

（8）上槽液：0.2 mol/L Trizma base；0.2 mol/L Tricine；0.4%（*m/V*）SDS。

（9）置换液：0.375 mol/L Tris-HCl，pH 8.8，50%（*V/V*）甘油，痕量溴酚蓝。

2.4　凝胶染色

2.4.1　考马斯亮蓝 G-250

（1）固定：50%（*V/V*）甲醇，10%（*m/V*）TCA。

（2）脱色：25%（*V/V*）甲醇，7%（*V/V*）乙酸。

（3）漂洗：25%（*V/V*）甲醇。

（4）染色液：17%（*m/V*）硫酸铵，34%（*V/V*）甲醇，0.5%（*V/V*）乙酸，0.1%（*m/V*）考马斯亮蓝 G-250。通常购买预制储液（如从 Sigma 购买），加 800 ml 水稀释到 1 L，然后取 40 ml 稀释的染色液加入 10 ml 甲醇（见注 1 关于固定谷蛋白）。

2.4.2　银染

（1）固定：40%（*V/V*）乙醇，10%（*V/V*）乙酸［若固定谷粒蛋白，则以 10%（*m/V*）TCA 替代］。

（2）敏化液：30%（*V/V*）乙醇，0.2%（*m/V*）硫代硫酸钠，0.5 mol/L 乙酸钠。

（3）银染液：0.25%（*m/V*）硝酸银。

（4）显影液：0.24 mol/L 碳酸钠，200 μl 的 37% 甲醛（终浓度 0.0074%）。

（5）终止液：0.04 mol/L EDTA。

2.4.3　Sypro Ruby™ 蛋白染色（BioRad，UK）

（1）固定：10%（*V/V*）甲醇，10%（*V/V*）TCA。

（2）Sypro Ruby™ 蛋白染液。

（3）脱色液：10%（*V/V*）甲醇，6%（*m/V*）TCA。

2.5　酶消化和质谱分析前的凝胶脱色

2.5.1　考马斯和 Sypro-染色后的凝胶块

（1）水

（2）乙腈（acetonitrile）

（3）NH_4HCO_3（0.1 mol/L）

2.5.2　银染后的凝胶块

硫代硫酸钠［sodium thiosulphate，20%（*m/V*）］、铁氰化钾［potassium ferricyanide 1%（*m/V*）］和水以 1∶1∶1 混合。

2.6　还原和烷基化（脲甲基化）

（1）DTT（10mmol/L）

（2）碘乙酰胺（55 mmol/L）

（3）NH_4HCO_3（0.1 mol/L）

2.7　酶消化

（1）胰蛋白酶酶解缓冲液：25 mmol/L NH_4HCO_3，5 mmol/L $CaCl_2$。

（2）胰蛋白酶浓度 0.125 μg/μl（Promega UK）（见注 2）。

2.8　多肽脱盐及富集

C-18 Zip tip 吸管尖（Millipore）

2.8.1　MALDI-MS（基质辅助激光解吸电离-质谱）

（1）润湿液：1∶1 乙腈（acetonitrile）：水

（2）样品液：0.1%（*V/V*）三氟乙酸（TFA）水溶液

（3）平衡液：0.1%（*V/V*）TFA 水溶液

（4）洗涤液：0.1%（*V/V*）TFA 水溶液

（5）洗脱液：1∶1 乙腈：水溶液配制 0.1%（*V/V*）TFA

2.8.2　ESI-MS（电喷雾-质谱）

（1）浸润液：1%（*V/V*）甲酸

（2）样品液：含 1%（*V/V*）甲酸的 4%（*V/V*）甲醇

（3）洗涤液：1%（*V/V*）甲酸

（4）洗脱液：含 1%（*V/V*）甲酸的 70%（*V/V*）甲醇

2.9　MALDI 目标点样

（1）含 49.5%（*V/V*）乙腈、49.5%（*V/V*）乙醇、1%（*V/V*）0.1% TFA 溶液配制 2 mg/ml α-氰基-4-羟基肉桂酸（α-cyano-4-hydroxycinnamic acid）。

（2）胰蛋白酶酶解产物，如乙醇脱氢酶（ADH）的酶切产物。

3. 方法

众所周知，在实验室内和实验室间难以保证双向聚丙烯酰胺凝胶电泳的重复性。在我们实验室，强制性地要求严格遵守标准操作程序（SOP），以确保不同的操作者可以获得可重复的分离结果。小麦白面粉样品的 2D 胶图谱示例如图 16.1 所示。采用

L88-6 RRes　L88-6 LARS

B73-6-1 RRes　B73-6-1 LARS

图 16.1　采用 Tris-$CaCl_2$ 提取液获得的小麦白面粉样品的 2D 胶图谱示例。2D 胶在所述条件下运行，用 Sypro Ruby™ 染色。L88-6 为非转基因的对照小麦亲本，B73-6-1 为来源于 L88-6 的转基因小麦品系，高比例地表达由自身启动子驱动的高分子质量的谷蛋白亚基 1Dx5。RRes 指英国赫特福德郡（Hertfordshire）的洛桑研究所，LARS 指北萨默塞特郡（North Somerset）的阿什顿（Long Ashton）研究站。这两个站点种植这些株系进行田间试验超过 4 年

$Tris\text{-}CaCl_2$提取法提取的并非“总蛋白”，而是小麦面粉中除谷蛋白之外的有代表性的蛋白样品。如果提取总蛋白，由于谷蛋白的含量很高，可能会掩盖掉其他较低丰度的蛋白质。同样的问题也可能发生在其他含有高丰度蛋白的组织中，尤其是绿色组织中存在的二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）。

我们提供了三种方法。第一种是以使用$Tris\text{-}CaCl_2$提取为特征的提取法，在我们实验室被用于转基因（GM）与非转基因（non-GM）小麦的实质等同性的大规模蛋白质组学研究。第二种和第三种提取方法被广泛用于文献中，可适用于各种不同组织。

3.1 蛋白质提取

3.1.1 利用$Tris\text{-}CaCl_2$缓冲液提取白面粉蛋白（参照［11］）

（1）2 g 白面粉加入 5 ml 预冷（4℃）提取液，4℃搅拌 30 min。

（2）4℃，10 000 *g* 离心 30 min，除去不溶物。

（3）保留上清于液氮中迅速冷冻，小份分装，储存于-80℃，待用。

（4）用 Bradford 法测定蛋白质含量，以 BSA 作标准品。

3.1.2 酸/丙酮沉淀法提取白面粉或绿色组织蛋白（参照［4］）

3.1.3 面粉

（1）在 50 ml Falcon 离心管中，悬浮 5 g 面粉于 20 ml 溶液Ⅰ中，以最大速度涡旋 2 min，-20℃静置 1h。

（2）4℃，15 000 *g* 离心 10 min。

（3）弃上清，加 5 ml 溶液Ⅱ涡旋以重悬沉淀。

（4）4℃，15 000 *g* 离心 10 min。

（5）重复步骤 3、4 两次。

（6）弃上清，在通风橱中，连续氮气流下干燥沉淀（确保无样品损失）。

（7）用 1 ml pH 适宜的复水缓冲液重悬 40 mg 干燥样品，涡旋 5 min，室温 13 000 *g* 离心 10 min。

（8）保留上清，小份分装。在液氮中迅速冷冻。

（9）储存于-80℃。

（10）用前测定小份样品的蛋白质浓度。

3.1.4 绿色组织

（1）使用预冷的研钵和研棒，液氮中研磨速冻的叶片。

（2）用 20 ml 溶液Ⅰ悬浮 2g 叶片粉末，以最大速度涡旋 2 min，-20℃沉淀 1h。

（3）4℃，15 000 *g* 离心 10 min，弃上清。

（4）加 5 ml 溶液Ⅱ，涡旋重悬沉淀，4℃，15 000 *g*，离心 10 min。

（5）重复步骤 4 两次，在通风橱中，连续氮气流下干燥沉淀，确保无样品损失。

（6）用 1 ml pH 适宜的复水缓冲液重悬 20 mg 干燥样品。

（7）涡旋 5 min，室温 13 000 *g* 离心 5 min。

（8）保留上清，小份分装。液氮中迅速冷冻，储存于−80℃备用。

（9）用前测定小份样品的蛋白质浓度。

如提取的蛋白中有叶绿素污染，可尝试 $PEG/MgCl_2$ 沉淀法（见注 3）。

3.1.5　奥斯本分级分离法（参照［12］）

（1）100 mg 面粉加 1 ml 水饱和正丁醇，室温下搅拌 1 h。

（2）室温下 5000 *g* 离心 10 min，去上清。这是一个可选的步骤，用于“除脂”。

（3）抽提“白蛋白/球蛋白”：沉淀（来自步骤 2）加 1 ml 0. 5 mol/L NaCl，室温下搅拌 1 h。如上述步骤离心，保留上清并重复抽提。

（4）合并上清，采用 5%（*V/V*）乙酸在 4℃充分透析 48 h，期间至少更换 4 次透析液，每次 5 L。

（5）抽提“醇溶蛋白”：沉淀（来自步骤 3）加 1 ml 70%（*V/V*）乙醇室温搅拌 1h。如前所述离心。保留上清并重复抽提。

（6）合并上清，5%（*V/V*）乙酸（至少更换 4 次，每次 5L 溶液），4℃充分透析 48h。

（7）抽提“谷蛋白”：沉淀（来自步骤 5）加 1 ml 50%（*V/V*）丙醇/2%（*V/V*）β-巯基乙醇/1%（*V/V*）乙酸，室温搅拌 1 h（注意：如有需要，可直接用 DTT 代替 β-巯基乙醇）。如前所述离心，保留上清并重复抽提。合并上清，5%（*V/V*）乙酸（至少更换 4 次，每次 5 L 溶液），4℃充分透析 48 h。

（8）透析后，冻干所有溶液。

（9）最终的沉淀（来自步骤 7）可用 1 ml“总蛋白提取缓冲液”（IEF 复水液）提取：室温下混合抽提 1h。如前所述离心，保留上清。分成小份，液氮中迅速冷冻，储存于−80℃。

3.2　等电聚焦（IEF）

各种长度（如 7 cm、13 cm、18 cm、24 cm）和不同 pH 范围的固定化 pH 梯度（IPG）胶条可供使用。IPG 胶条常在 20℃下（温度低于 20℃可导致尿素结晶）于适量水化液中水化过夜（16 h）。这可在溶胀托盘（re-sweling tray）或直接在胶条槽（strip holder）内完成。无论选取何种方法，必须保证胶条和容器底部间的气泡都被移除。该步完成后，胶条需覆盖上不导电的油。如果水化是在溶胀托盘内进行的，还必须转移到胶条槽上运行。IEF 参数设置取决于胶条长度，但始终在 20℃完成。若温度高于 20℃，可能导致蛋白质修饰，如尿素产生的氰酸铵（ammonium cyanate）导致的氨甲酰化（carbamylation）。一旦等电聚焦完成，沥去多余的覆盖油，储存胶条于−80℃。本说明假定使用的仪器是 GE Healthcare IPGphor。

胶条水化

（1）对于 24 cm IPG 胶条：融化 4 ml 水化液，加入 DTT 和 IPG 两性电解质至以下浓度：DTT 40 mmol/L；两性电解质 0.5%（V/V）。

（2）对于 pH3~10 的 IEF，加入适量的样品至水化液中，使每根胶条上样 400 μg 蛋白质。理想条件下每根胶条须用 50~100 μl 样品。对于 24 cm 胶条，蛋白质样品和水化液的总体积应为 450 μl。理想条件下水化液：样品比例不应小于 3：1。

（3）无论水化是在 IPG Manifold（多功能盘）还是直接在单根胶条槽内进行，用移液器从 24 cm、12 道槽的溶胀托盘（reswelling tray）的槽一端加入 450 μl 缓冲液和蛋白质混合液（见注 4）。

（4）对于 pH6~11 间的 IEF，除了两性电解质以 pH6~11 代替 pH3~10 外，所用蛋白质和缓冲液的总体积与 pH3~10 一样。此外，水化液是从槽一端加入，样品单独加在正极端（+）。

（5）放置干胶条（Immobiline DryStrip™），胶面朝下，置于溶胀托盘的槽中，确保胶条下无气泡。

（6）用 DryStrip™覆盖油覆盖，加盖封上，20℃水化 16~18h（过夜）。

（7）取走胶条（使用镊子），去除多余覆盖油。

（8）胶面朝上，放入 24 cm IPGPhor Manifold 多功能盘中（最多可达 12 根）。

（9）将胶条排列在每个槽的中间，以 DryStrip™覆盖油覆盖。即使未使用，也要将所有槽内填入覆盖油。

（10）润湿电极滤纸片，吸去多余水分。

（11）将电极滤纸片置于胶条的两端，轻微接触胶条。

（12）将可移动电极固定于 24 cm IPGPhor Manifold 多功能盘中。将电极置于滤纸片与胶条接触部分。

（13）固定好电极位置，盖上 IPGPhor 电泳仪的盖子。

（14）IEF 运行的条件必须根据不同的提取物凭经验决定。但以下参数适用于面粉/Tris-$CaCl_2$ 法提取物：500 V、1 h；1000 V、1 h；8000 V、8.20 h。总计 65 500 V·h。

（15）IEF 结束后，移出胶条，除去多余覆盖油，将胶条置于 10 ml 塑料吸管中（去掉尖端使胶条能放入）。用封口膜密封，储存于-80℃。

3.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

3.3.1 使用仪器为 GE Healthcare Ettan Dalt II

（1）玻璃板用清洁剂浸泡过夜，去离子水冲洗，再用乙醇和 RO（反渗透）水冲洗，风干。

（2）根据使用说明书将凝胶板组装（见注 5 关于硅密封胶的使用，如果使用的是非自封的胶板，确保胶板四周完全密封）。

（3）制备多块胶时，在每块凝胶盒间用可重复使用的塑料垫片隔开，将凝胶盒装

入制胶盒。保证凝胶盒紧密填充，且通过用硅脂涂抹橡胶密封垫使前板与灌胶盒形成完好密封。拧紧面板上的螺栓，水平放置灌胶盒。

（4）接上制胶管和漏斗，用夹钳和立架保持垂直。

（5）如使用取代液，漏斗准备就绪后加入 100 ml 替换液至平衡室。如果不使用替换液，在灌胶后可通过用大量热水从管内冲走聚合的丙烯酰胺。

（6）12 块 10% 的凝胶使用 1 L 凝胶溶液：250 ml 1.5 mol/L Tris-HCl，pH 8.8；333 ml 30%（*V/V*）Duracryl 0.65%（*m/V*）bis；407 ml 水。搅拌，置于 2 L 布氏烧瓶中除气 15 min。

（7）加入 10 ml 10%（*m/V*）SDS，稍加搅拌。

（8）用前加入 2.5 ml 10% APS 和 0.5 ml TEMED，搅拌。

（9）将丙烯酰胺溶液灌入漏斗，不断补足（重要的是不能使漏斗中溶液完全流空，否则会在胶内形成气泡）。持续加液直至胶面离第一块前板顶端 1~2cm（约 1 L）。

（10）移去漏斗，使替换液向下流入灌胶模具（caster）底部的 V 形槽。

（11）在每块胶顶端覆盖 1 ml 水饱和正丁醇，放置 3~4 h 待凝胶聚合。

（12）一旦聚合完成，拆除灌胶盒，移去凝胶盒，用去离子水漂洗凝胶盒以去除水饱和丁醇，以及少量附着在凝胶盒外面上的小块凝胶。

（13）配制 1∶4（RO 水）稀释的 1.5 mol/L Tris-HCl（pH 8.8）作为凝胶存储液使用。

（14）将凝胶置入一个大的塑料盒，加入足够的凝胶存储液以完全覆盖凝胶。

（15）凝胶在 2~4℃“成熟”10~14 天之后可供使用，但从制胶之日起一个月以后不能再用。

3.3.2　凝胶电泳

（1）每根 IPG 胶条用 10 ml 冻存的预制平衡液，在 4℃冰箱或冷室解冻过夜。

（2）准备 7L 下槽液：25 mmol/L Trizma 碱，15 mmol/L 冰醋酸。

（3）将缓冲液倒入 Ettan Dalt II 槽，打开泵冷却到 15℃。

（4）准备上槽液：3 L 200 mmol/L Tris 碱，0.4%（*m/V*）SDS，200 mmol/L Tricine。

（5）用水冲洗 IPG 胶条去除多余覆盖油，在含 1%（*m/V*）DTT 的 10 ml 平衡液中平衡 15 min。

（6）弃去平衡液，再加入 10 ml 含 4%（*m/V*）碘乙酰胺的平衡液温育 15 min。由于碘乙酰胺感光，管子外要包上铝箔。

（7）将第二向胶从冷藏处取出，用上槽液清洗凝胶顶端 3 或 4 次。

（8）向凝胶盒槽内填灌上槽液，并加载胶条。按惯例，胶条的酸性端是在凝胶的左边。确保胶条和凝胶间没有气泡存在。

（9）润湿凝胶盒边缘，以顺利穿过橡胶密封管的通路，将凝胶放入电泳槽。如果不足 12 块胶，则使用 Perspex 空白。

（10）加入上槽液，避免影响凝胶盒槽，盖上盖子，使用以下参数运行：第 1 步：恒功率 = 60 W（5 W/胶）；时间 0.15 h；温度 = 15℃；泵 = 自动。第 2 步：恒功率 =

120 W（10 W/胶）；时间 2 h；恒功率 = 240 W（20 W/胶）；时间 6 h；温度 = 15℃；泵 = 自动。

（11）当染料前沿离胶底端 0.5~1.0cm 时停止电泳。总的运行时间约 8h。

（12）撬开玻璃盒，每块凝胶切角以指示方向。将凝胶置入合适的染液（见后述）。

3.4 凝胶染色

为了用蛋白质组学研究 2D 胶上蛋白点，染色必须与质谱分析兼容，且灵敏度越高越好。符合这些标准的染色法有好几种可供使用，包括胶体考染、某些银染和各种荧光染剂，如 Sypro Ruby™、Orange、Deep Purple 和 Flamingo。胶体考染灵敏性不如银染和荧光染料，但是便于使用且相对便宜（见注 6 关于灵敏度部分）。银染是一种多步式的过程，但能使较低丰度蛋白显现。然而，由于没有终止点，高丰度蛋白可能会过度着色。同时，银染的重复性可能不佳，因为染色程度取决于操作者。所有染色过程都需要在振荡器或摇床上进行，在染色/脱色过程中提供温和的振荡。

3.4.1 胶体考马斯亮蓝 G250

（1）在 50%（*V/V*）甲醇、10%（*V/V*）乙酸（或 TCA）中过夜固定凝胶。

（2）在胶体考马斯染料中染色（按照使用说明书用甲醇稀释）（Bio-rad；4∶1 染料∶甲醇）。

（3）用 25%（*V/V*）甲醇，7%（*V/V*）乙酸脱色 1~5 min。

（4）用 25%（*V/V*）甲醇脱色过夜，保存在水中。

3.4.2 银染（参照［13］）

（1）凝胶用 40%（*V/V*）乙醇、10%（*V/V*）乙酸（或 TCA）固定 30 min。

（2）置于“敏化液”中 30 min：30%（*V/V*）乙醇，0.2%（*m/V*）硫代硫酸钠（sodium thiosulphate），0.5 mol/L 乙酸钠。

（3）用蒸馏水洗三次，每次 5 min。

（4）加入银溶液［0.25%（*m/V*）硝酸银］，染色 20 min。

（5）用蒸馏水洗两次，每次 1 min。

（6）置于“显影液”中：0.24 mol/L 碳酸钠，每升溶液加 200 μl 37% 甲醛（0.0074% 终浓度）。

（7）溶液变得混浊或 10 min 后加入新鲜显影剂。继续显影直到达到所要求的染色程度。

（8）加入 0.04 mol/L EDTA 10 min 终止反应。

（9）用蒸馏水洗两次。

（10）保存在水中。

3.4.3 Sypro Ruby™ 蛋白染色

（1）胶用 40%（*V/V*）甲醇，10%（*V/V*）TCA 固定过夜（18h）。

（2）用 Sypro Ruby™染料在暗处染色过夜。Sypro Ruby™是光敏感的，所以凝胶需要在暗室中处理，凝胶储存盒要盖上铝箔。

（3）凝胶用 10%（*V/V*）甲醇、6%（*V/V*）TCA 脱色。

（见注 7 关于 Sypro Ruby™的使用和废液处理）

3.5 凝胶成像与分析

有不同厂商的成像系统可供使用。扫描仪必须具有高分辨率，如需进行凝胶斑点质谱分析，扫描仪还要与切点仪（spot picker）结合。

同样的，有许多软件包可供使用，允许凝胶匹配，产生合成（或参照）凝胶。斑点体积、峰高和峰面积也可通过不同程序包获得，因而能对处理进行比较。有必要进行进一步的数据分析，如主成分分析（PCA），所以胶分析程序包所得的数据必须能转换成 Excel 数据表，并与统计软件包兼容。

3.6 酶解前胶块脱色（参照［14］）

3.6.1 对于考马斯和 Sypro Ruby™染色凝胶块

（1）在水中浸置 15 min，弃去水，继续在 50∶50 的水∶乙腈中再浸置 15min。

（2）重复上述清洗步骤。

（3）倒去所有液体，用乙腈覆盖胶块 5 min，此时胶块应该不透明并脱水。

（4）弃乙腈，加入 0.1 mol/L NH_4HCO_3，使胶块再水化，放置 5 min。

（5）加入乙腈使乙腈∶NH_4HCO_3比例为 1∶1，孵育 15 min。

（6）弃液体，抽真空离心使之干燥。

3.6.2 对于银染胶块

（1）将胶块放入“Farmer's 还原剂”［20%（*m/V*）硫代硫酸钠、1%（*m/V*）铁氰化钾与水 1∶1∶1 混合］直到胶块完全干净。用水冲洗。

（2）弃液体，抽真空离心使之干燥。

3.7 还原和烷化（参照［14］）

（1）胶块在 10 mmol/L DTT、0.1 mol/L NH_4HCO_3中，56℃ 浸置 45 min 使之泡胀。倒去多余液体，迅速换以 55 mmol/L 碘乙酰胺、0.1 mol/L NH_4HCO_3，室温，暗处孵育 30 min。

（2）弃去碘乙酰胺溶液，用 1∶1 乙腈∶0.1 mol/L NH_4HCO_3清洗胶块 15 min。

（3）弃液体，抽真空离心使之干燥。

3.8 酶解

胰蛋白酶胶内消化（参照［14］）：

（1）加入足量的胰蛋白酶溶液，刚好覆盖胶块，冰浴 45 min 使之泡胀。

（2）弃去多余液体，加入 25 mmol/L NH_4HCO_3/5 mmol/L $CaCl_2$，刚好覆盖胶块。

（3）37℃温育过夜。

（4）肽段分离：快速离心收集消化物到底部，加入最小体积 25 mmol/L NH_4HCO_3，室温孵育 15 min。

（5）加入等体积乙腈，混匀，室温下孵育 15 min。

（6）收集上清，再用5%（*V/V*）甲酸：乙腈（1：1）重复抽提两次。

（7）合并上清，抽真空离心使之干燥。

3.9　利用 Zip Tips 为质谱分析进行多肽除盐和浓缩

3.9.1　MALDI-MS

（1）10 μl 0.1%（*V/V*）TFA 重悬消化物。

（2）10 μl 50：50 乙腈：水润湿吸管尖，重复两次。

（3）10 μl 0.1%（*V/V*）TFA 平衡管尖，重复两次。

（4）上下吸抽 10 次将样品吸入管尖（将多肽吸附到 tip）。

（5）0.1% TFA 清洗管尖。

（6）用 4 μl 50：50 乙腈：水，0.1% TFA 洗脱。

3.9.2　ESI-MS（参照［15］）

（1）10 μl 含 1%（*V/V*）甲酸的 4%（*V/V*）甲醇重悬消化物。

（2）10 μl 1%甲酸润湿吸管尖，重复两次。

（3）上下移液 10 次进行蛋白质消化。

（4）用 10 μl 0.1%（*V/V*）甲酸清洗管尖。

（5）用 4 μl 含 1%（*V/V*）甲酸的 70%（*V/V*）甲醇洗脱。

3.10　MALDI 靶板点样

（1）1 μl 消化物与 1 μl 基质混合。

（2）点样于 MALDI 靶板，室温下风干。

4. 注释

注 1：由于谷物储藏蛋白可能溶于乙酸溶液，固定这类蛋白质需用 TCA 代替乙酸。

注 2：用 50 mmol/L 乙酸溶解胰蛋白酶，分成小份，储存于-20℃。取一小份加入酶解缓冲液，工作浓度约为 0.125 μg/μl。

注 3：沉淀 Rubisco［16］：加入 60% PEG（*m/V*）使最终 PEG 浓度为 20%（*m/V*）（如每 10 ml 提取物加 3.75 ml 60% PEG 4000）。按每 10 ml 提取物加 0.2 ml 的比例加 1 mol/L $MgCl_2$，轻柔混匀，置混合物于冰上至少 10 min。Rubisco 可通过离心去除。

注 4：为了在胶条槽（strip holders）直接水化干胶条，胶面朝下置于水化液（含样

品）中，确保没有气泡存在。用矿物油覆盖，盖上盖子。将胶条槽放入IPGPhor，水化16~18 h，然后直接进入IEF程序。IEF结束后移开胶条，去除多余矿物油，冻于-80℃或如第3.3节（凝胶电泳）步骤5所述，在还原和烷化后用于第二向胶。

注5：组装后可用硅密封胶密封板边缘。如使用硅密封胶，需要3~4天使密封胶凝固。凝胶电泳完毕后，清洗玻璃板前必须用刀片除去密封胶。

注6：胶体考马斯灵敏度约100 ng水平，而银染和荧光染料可检测到10~50 ng的水平（取决于你信任哪篇文献！）。

注7：如不需要凝胶匹配，则Sypro Ruby™可使用超过一次。如需要凝胶匹配，最好使用新鲜的Sypro Ruby™，因为重复使用可能在胶上产生斑点。Sypro Ruby™清理：没有资料表明Sypro Ruby™蛋白凝胶染色的毒性。染剂含有有机成分和重金属成分(钌)。关于清理，Sypro Ruby™溶液需用小量冰醋酸酸化，灌注通过活性炭或其他可燃材料，然后在装有适宜的补燃器/洗涤器系统的化学焚化炉中燃烧以去除染料。当处理燃料时，应予遵守联邦、州和地方政府的所有环境条例。

致谢

洛桑研究所（Rothamsted Research）受到英国生物技术和生物科学研究理事会（BBSRC）的基金资助。该工作受到食品标准局下的G02项目的支持。

（楚　璞　邓志平　译）

参考文献

1. Safety Evaluation of Foods Derived Through Modern Biotechnology: Concepts and Principles (1993) OECD, Paris.
2. Kuiper, H. A., Kleter, G. A., Noteborn, H. P. J. M. and Kok, E. S. (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J.* 27, 503-528.
3. Shewry, P. R., Baudo, M., Lovegrove, A., Napier, J., Ward, J., Baker, J. and Beale, M. (2007) Are GM and conventionally bred cereals really different? *Trends Food Sci. Technol.* 18, 201-209.
4. Skylas, D. J., Mackintosh, J. A., Cordwell, S. J., Basseal, D. J., Walsh, B. J., Harry, J., Blumenthal, C., Copeland, L., Wrigley, C. W. and Rathmell, W. (2000) Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 32, 169-188.
5. Amiour, N., Merlino, M., Leroy, P. and Branlard, G. (2002) Proteomic analysis of amphiphilic proteins of hexaploid wheat. *Proteomics* 2, 632-641.
6. Salt, L. J., Robertson, J. A., Jenkins, J. A., Mulholland, F. and Mills, E. N. C. (2005) The identification of foam-forming soluble proteins from wheat (*Triticum aestivum*) dough. *Proteomics* 5, 1612-1623.
7. Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Cari, N., Wong, J. H., Buchanan, B. B. and Hurkman, W. J. (2005) Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5, 1594-1611.
8. Ruebelt, M. C., Leimgruber, N. K., Lipp, M., Reynolds, T. L., Nemeth, M. A., Astwood, J. D., Engel, K. -H. and Jany, K. -D. (2006) Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical variation. *J. Agr. Food Chem.* 54, 2154-2161.
9. Ruebelt, M. C., Lipp, M., Reynolds, T. L., Astwood, J. D., Engell, K. -H. and Jany, K. -D. (2006)

Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. Assessing natural variability. *J. Agr. Food Chem.* 54, 2162-2168.

10. Ruebelt, M. C., Lipp, M., Reynolds, T. L. Schmuke, J. J., Astwood, J. D., DellaPenna, D., Engel, K. -H. and Jany, K. -D. (2006) Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing unintended effects. *J. Agr. Food Chem.* 54, 2169-2177.
11. Finnie, C., Mechior, S., Roepstorff, P. and Svensson, B. (2002) Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiol.* 129, 1308-1319.
12. Osborne, T. B. (1907) *The Proteins of the Wheat Kernel.* Publication No 84, Carnegie Institute.
13. Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R. A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H. and Dunn, M. J. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 3666-3672.
14. Jensen, O. N. Wilm, M. Shevchenko, A. and Mann, M. (1999) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels, in. 2-D Proteome Analysis Protocols, (Link, A., ed.), *Methods in Molecular Biology Series*, *Vol.* 112, Humana Press, Totowa, pp. 513-530.
15. Kristensen, D. B., Imamura, K., Miyamoto, Y. and Yoshizato, K. (2000) Mass spectrometric approaches for the characterisation of proteins on a hybrid quadrupole time-offlight (Q-Tof) mass spectrometer. *Electrophoresis* 21, 430-439.
16. Hall, N. P. and Tolbert, N. E. (1978) A rapid procedure for the isolation of Rubisco from spinach leaves. *FEBS Lett.* 96 167-169.

第 17 章　实质等同性：代谢组学

Michael H. Beale　Jane L. Ward　John M. Baker

摘　要： 现代"代谢组学"方法可用于自动比较大量样本中一些结构不一的化合物含量。该技术非常适合于筛选植物群体，包括发现转基因引起的非预期效应。目前已有几种可用于实质等同性分析的代谢组学方法。我们开发了一种利用［^{1}H］-NMR 指纹识别筛选植物的代谢组学方法，并利用它分析田间生长的转基因小麦的实质等同性。本文以研究来源于试验田的小麦所加工的面粉为例，描述了该方法的原理和细节。本文重点描述了下游数据处理和通过多变量分析对光谱进行比较，以此来评估在自然环境引起的变异为背景的转基因所导致的代谢组变化。

关键词： 代谢组学，NMR 光谱学，多变量分析

1. 引言

在选择所期望品质的植物株系时，代谢物的定量和定性分析往往起一定作用。目前，植物代谢组学这一相对新的学科的进展，已大大扩展了我们进行广泛的代谢物研究的能力。这些数据连同表型、质量性状和其他"组学"数据已纳入范围更广的"系统学"方法。植物代谢组学技术可应用于转基因或非转基因的新作物的实质等同性研究，以及植物科学的其他相关领域，如品种培育、QTL 分析、病虫害抗性和功能基因组学。监管当局关心的问题是，转基因可能引起代谢变化从而产生有害化合物。科研人员能预测及方便地检测转基因对于代谢的直接作用。然而，人们还存在对于转基因的间接影响的担忧，因为转基因可能失活内源基因，或产生新的活性酶并与不同底物接触，从而产生新的代谢物。

代谢组学分析方法是利用经典化学光谱学，如核磁共振（NMR）、质谱分析（MS），并常结合气相、液相或毛细管电泳色谱分析系统。大部分代谢组学实验室配置了一些基于生物学应用的技术。这些技术可概括分为"定向"方法和"非定向"方法［1］，都被用于转基因植物的实质等同性研究［2~6］。定向分析是对特定的化合物或化合物类别的分析，长期以来支撑着植物代谢工程的研究，以及自然资源采集和育种过程中的性状选择等领域。定向研究通常是相对低通量的，且预先需要样品清理过程。此外，它常包含特定的衍生化、色谱分离，以及对感兴趣物最佳应答的探测系统。相反，现代自动光谱分析仪采集高通量的样品数据，结合化学计量学计算方法，彻底创新了人们进行大规模非定向分析的能力，而无需纯化特定的化合物类型。这种技术尤其适用于筛选大量样本而不偏向特定代谢物，因而很适用于研究转基因引起的非预期效应和确定

质量性状选择的生物标记。

［^{1}H］-NMR 筛选和直接输注电喷雾电离质谱［2，3，7］能提供初提物互补的指纹，应用这些技术是确立实质等同性的一个好的起点。如果用作大规模试验的一个部分，这种筛选可用来研究以环境变异为背景的代谢组的差异。随后，可用定向分析进一步研究初筛时发现的差异。本文介绍了我们开发的适用于研究田间小麦［3］的［^{1}H］-NMR 指纹识别的详细操作过程［7］，同时讨论了实验设计、取样、生物重复和技术重复的关键问题，并提供了 NMR 数据处理和多变量分析的详细指导。有关多变量分析应用和其他 NMR 数据模式匹配技术，Lindon 等［8］精彩的综述给出了更全面的指导。

2. 材料

（1）Eppendorf 聚丙烯管，1. 5 ml（Eppendorf UK，Cambridge，UK）。

（2）［^{1}H］-NMR 抽提剂，准备足量使整体批次中每个样本加 1 ml，包含 80%（*V/V*）氧化氘（D_2O，99. 9% D，Goss Scientific，Great Baddow，Essex，UK）、20% 氘代甲醇（CD_3OD，99. 8% D，Goss Scientific）和 0. 05%（*m/V*）deuterotrimethylsilylpropionate（氘代三甲基硅烷基丙酸盐，d_4-TSP，Goss Scientific）。

（3）洁净、干燥的 5mm 薄壁 NMR 管。

（4）现代 NMR 波谱仪，以［^{1}H］频率 400MHz 最小值运行，使用专用^{1}H 探针和现代软件，具批处理和光谱编辑功能最为理想（我们使用的是 XWIN-NMR 和 AMIX，购自 Bruker Biospin，Rheinstetten，Germany）。

（5）SIMCA-P 多变量统计软件（Umetrics，Umea，Sweden）。其他类似的软件包有 Pirouette（Infometrix，Bothell，WA，USA）和 Spotfire（Spotfire Inc.，MA，USA）。

3. 方法

本章描述的方法最适合于分析小麦精白面，但改进后也适用于全面粉、麦麸或其他组织，如叶和根。在开展实质等同性代谢组学实验前，如其他任何田间试验或温室试验一样，要考虑的关键步骤包括田间试验设计（见注 1）、组织取样（见注 2）和样本标记（见注 3）。

3.1 代谢物提取和 NMR 样品准备

（1）从白面粉的每一个生物重复中，称取 3 份 30 mg（±0. 03 mg）的样品，分别装入标记好的 1. 5 ml Eppendorf 管。在整个实验中，生物重复和技术重复都要随机化（见注 4）。

（2）加入 1 ml NMR 抽提剂（见上述），盖上管盖。

（3）涡旋混匀管内内容物，直到面粉完全分散（通常大约 30s）（见注 5）。

（4）将离心管在（50±1）℃准确加热 10 min。可使用聚苯乙烯浮子和预热的水浴锅

来完成。离心管应放置好使内容物在水浴面下。

（5）从水浴锅中取出后，迅速将离心管转入微型离心机离心 5 min。

（6）从每管中取 800 μl 上清液，加入到干净的、标记好的 1.5 ml 聚丙烯管中。

（7）(90±2)℃热激溶液 2 min（见注 6），如前所述，使用预热的水浴锅。

（8）将浮子从水浴锅取出后，迅速将离心管转移到管架上，置于冷库（4℃），在该温度下放置 45 min。

（9）当样品保持低温时，微型离心机全速离心 5 min。

（10）取 0.70 ml 上清液加到一个干净的标记的 5 mm 薄壁 NMR 管，加盖准备分析（见注 7）。

3.2　NMR 数据收集

（1）将 NMR 管放入 NMR 自动采样器架上，在仪器工作记录本上记录它们的位置。

（2）确认 NMR 波谱仪内可变温度单元设置为 300K。

（3）在自动程序的样品列表输入样品细目，务必准确地输入适当的样品标记。对于输入的每个样品，选择 D_2O 作为样品溶剂，扫描所需数目是 1024，参数设置为 WATERSUP（见注 8~10）。

（4）开始自动程序。随后 NMR 软件自动装载每个样品进入 NMR 磁体，寻找 D_2O 信号并锁定、优化信号强度（通过自动匀场程序），设置接收器增益，然后收集 NMR 数据。数据收集结束前，NMR 自动程序例行自动处理数据并保存文件，随后继续下一个样品（见注 11）。

3.3　NMR 数据：肉眼检查和质量保证

（1）在整个实验结束后，打开 AMIX（Analysis of Mixtures，Bruker Biospin，Germany）软件，从 XWin NMR 指令选择 File>Open。在弹出窗内输入合适的存放实验数据文件的文件位置，点击“OK”。

（2）在弹出框内选择整个实验所有样品记录，点击“OK”。

（3）所有的 NMR 图谱此时都应在主窗口展示。检查文件确保获得满意数据（见注 12）。

（4）对步骤 3 中数据未满意的样本重新进行鉴定（见注 13）。

（5）当数据被收集和质量评估后（见注 14），从 NMR 管中取出样品，转移到螺帽玻璃瓶中。将这些瓶子储存在冰箱中，以备将来分析所需。

3.4　数据处理、数据库和光谱存储

在分析数据包中的数据之前，还需要对数据进一步处理。在这一步骤中，包括在 Bruker NMR 波谱数据库中（SBase）（AMIX software 的一部分）对数据的准备。做这一步的缘由是为了确保数据集的高可比性，降低数据的复杂度，使 32k 数据点转换为含有约 1k 数据点的矩阵。由于样品 pH 的微小差异会导致某些信号中微弱化学位移差异，而“bucketing”这一过程能消除位移差异所导致的数值校准问题。

（1）打开 AMIX（Analysis of Mixtures，Bruker Biospin，Germany）软件，选择 AMIX Tools >Prepare Data。

（2）在准备数据窗口，通过从 XWin NMR 指令选择 File>Open 打开需要加入到 SBase 的文件。在弹出窗内输入存放实验数据文件的合适位置，点击“OK”。

（3）在弹出框内选择整个实验所有记录，点击“OK”。

（4）所有的 NMR 图谱此时都应在主窗口展示。

（5）在 δ0. 00 处放大 d_4-TSP 峰值。这是内标峰值。设置这一峰值为最大高度（见注 15）。

（6）重设缩放，使整个波谱宽度都能呈现。

（7）选择批处理功能，在弹出窗口选择以下选项：

（i）删除负峰；

（ii）使用用户定义范围 δ10. 0~10. 2 减噪。

（8）输入第 1 个样品的样品名（见注 16）。

（9）将这个光谱保存至光谱数据库（SBase）后把它关闭，输入列表中下一个光谱的样品名。

（10）将所有数据保存到 SBase 后，关闭样品准备窗口，开启“Buckets”窗口（AMIX Tools >Buckets）。

（11）选择“Create new bucket table”，在弹出窗口中选择“data from SBase”。

（12）会再有一个窗口弹出。定位待 bucket 数据。

（13）在 Bucketing 选项窗口选择（见注 17）。

（i）待 bucketed 的数据范围（δ9. 5~0. 5 ppm）

（ii）Bucket 宽度（0. 01 ppm）

（iii）包容峰（所有正峰）

（iv）按比例缩放法（按参考区域设定比例）

（v）参考区域（δ0. 05 ~-0. 05）·

（vi）排除（无）

（14）用电子数据表包如 Microsoft Excel 打开 bucket 表。

（15）增加额外的行标签辅助将来数据分析（如株系、处理、时间点）。

（16）去掉对应于残留水（δ4. 775~4. 865）和甲醇（δ3. 285~3. 335）的行。

（17）以 Excel 工作表形式保存文件。

3. 5　多变量分析（见注 18）

（1）打开 SIMCA-P 软件（其他类似的软件包也可使用。具体的操作可能不同，但原理相同）。

（2）创建新项目（File >New），选择分析文件（由上一步创建）（见注 19）。

（3）转置数据集（Commands >Transpose dataset），使化学位移为列数据而样品为行数据。

（4）突出化学位移首行，选择该行作为主要变量 ID。

（5）突出包含样品名的列，选择该列作为主要观测 ID。

（6）突出任意描述列，将这些列赋值为定性 X 数据。

（7）继续上传数据。一旦启动，不要排除任何数值（见注 20）。

（8）双击数据模型，选择“workset”（工作集）按钮。

（9）选择缩放比例选项，突出所有数据，选择缩放方法“ctr”。这样通过减去平均值使数据以零为中心。

（10）通过选择变量选项和选定描述数值，排除 PCA（主成分分析）模型中任何定性数值。排除这些条目。

（11）自动适配并检查 PCA 模型（见注 21）。

（12）此时可以分析 PCA 得分图（见注 22）。不同的成分图应该用不同的聚类模式分析。PC1 对 PC2 必须检测，因为这些成分常常能解释数据集当中最大的变异。

（13）根据你的描述信息（株系、处理等），利用颜色编码变量，这样便于观察数据集的趋势。

（14）对于每个得分图，应该生成两个对应的载荷图（见注 23）以描述导致群集差异的代谢物。

（15）载荷图中的正负峰都能按照群集间代谢物变化赋值。这可以通过比较使用同一光谱仪在同等条件（溶剂、温度、脉冲程序）下运行正宗的纯化合物，而且采用 AMIX 在同样条件下 bucketed 收集的 NMR 频谱库实现（见注 24）。

（16）如果没有清晰的群集，可进行判别分析。这包括在建模前设定类别到数据集，以及使用该信息以“强加”数据集中的差异。相应的得分和载荷图可以如前所述观察（见注 25）。

（17）在生成载荷图的过程中，收集引起差异的数值点的信息。这只提供线索。同时也需要检查原始数据以确认代谢物的赋值和变化。载荷图的所有区域都应检查到，因为某些情况下，非常小的峰的强度变化可以比频谱中非常大的峰上的微小变化更有意义。

3.6　确定实质等同性

PCA 得分图能够快速评估样品间的相似和差异程度。载荷图用于鉴定导致差异的代谢物。目前，大多数研究［2，3］认为栽培品种间的差异和环境的差异比转基因的影响更大。然而，对于导入的代谢酶或其调节物，也应考虑导入的基因对特定代谢物的直接作用。有必要建立不同的 PCA 模型，以检测环境对转基因/非转基因作物的影响。如果去除了环境差异和品种差异后，转基因对非转基因的得分图并没有形成独立集，在分析技术所限定的范围内，认为转基因与非转基因具实质等同性。更先进的监督模型，如 PLS 或神经网络［8］可用于进一步探究数据集是否有差异。

4. 注释

注 1：在植物代谢组学实验中，特别是那些涉及田间种植材料的实验，由于受环境影响，小区设计必须提供足够的生物学重复并随机化，从而减少小气候和土壤的影响。

理想条件下，必须进行多点试验，并在多个生长季节重复。

注 2：植物材料的取样要谨慎地操作并做好记录，这点极其重要。代谢组是高度动态的，所有取样应在光照周期的同一时间进行，采集的组织要放入液氮中以阻止新陈代谢。最好在取样时就将植物或植物部分归并成样品池。处理前这些组织要保存在 −80℃。本研究中，同一试验田的 350 株植株的谷粒用于磨制面粉。

注 3：样品标注应反映生物学特性，并标注株系、小区编号、处理、生物学重复和技术重复。在开始实验前仔细考虑这一点，以利于后续数据处理，特别是多变量分析。

注 4：在整个实验排序中，应随机排列分析样品和示踪样品，这有助于保证整个实验的质量。在数据分析阶段，技术重复要群集，示踪样品也一样。这些样品能用于评价提取过程的可重复性。

注 5：这一阶段，任何不能悬浮于溶剂中的物质，都会导致提取过程中更大的变异性。

注 6：我们发现热激步骤对于谷物和面粉提取物特别重要。即使溶剂为 20% 甲醇，诸如 α-淀粉酶的水解酶仍具有活性。这将导致提取物中碳水化合物的组成随时间发生变化。样品阵列随机排列的技术重复所获得的 NMR 图谱中，这一变化明显可见。我们已证明 90℃/2 min 的热激反应能消除这一问题，同时 NMR 频谱也保持稳定。这一问题在冻干的绿色组织中不那么明显，但所有用水性溶剂进行代谢组学提取方法时最好结合热激。

注 7：在进行大型实验前应评估样品的稳定性。这可比较新鲜样品与几天后样品的 NMR 波谱来评估。这一重要步骤保证了在自动取样器采集数据前，样品保持稳定。按所述方法制备的小麦粉提取物，其样品能保持数天的稳定。

注 8：WATERSUP 参数集设置是一个标准的 Bruker 参数集。利用弛豫衰减时间 5s 残余的 HOD 信号通过预饱和被抑制。参数集可以修改，以设定所需扫描的数目和通用的溶剂，使这些设置不需要为每个单独的样品做校正。

注 9：在本方法中，NMR 波谱仪在 399.752 MHz 操作，并使用 5 mm 多核的宽带探针。

注 10：每个频谱由包含 32k 数据点的 1024 次扫描构成，谱宽为 4845 Hz。使用更高频场仪器时，扫描数可以减少。例如，600 MHz 和 5 mm 逆探针条件下，这些样品需要 128 次扫描得到类似的信噪比。

注 11：WATERSUP 参数集要求一个独立的程序来处理频谱。在自动操作中，频谱在应用指数窗口功能、采用 0.5 Hz 线加宽设置后，自动挡进行傅里叶转换。定向和基线校正的进行也在自动程序内。[^{1}H] -NMR 化学位移以 x 轴上的 TSP-d（在 δ0.00）为参照。频谱在 y 轴上也根据最高峰（在这个方法中为 TSP）按比例缩放。

注 12：每个 NMR 波谱都覆盖在所有其他波谱上。当比较整个实验的数据文件时，很容易辨认出有问题数据的文件。明显的问题是峰宽过宽或数据峰位移动极端嘈杂。数据不一致的原因为样品没有锁定造成，线宽问题常常因劣质 NMR 管或电压尖峰引起的数据收集中断。但要注意的是，相对来说很少样品会确实产生劣质的数据。

注 13：对大型试验而言，最好在实验进行中对数据进行“质量评价”，在样品从 NMR 自动取样器中取出前，对任何需重新测定的样品马上进行操作。为避免重新测定

样品所带来的混乱，应以原始数据集中的原有文件名运行，从而覆盖掉前面劣质的频谱数据。这能避免劣质的波谱数据进入下一阶段的分析，也能简化频谱选择过程。

注 14：极性溶剂提取磨碎小麦籽粒的提取物典型的 NMR 波谱图如图 17.1 所示。与植物绿色组织提取物的频谱相比，该频谱相对简单，主要由碳水化合物和氨基酸信号构成。要评估提取方法的可重复性，同一生物样品重复分析的波谱可以被覆盖。图 17.2 所示的是所期望优良的可重复性分析，以及作为对比的较差可重复性的频谱样品。

注 15：由于内标物加入到了初始溶剂混合物中，从而加入到每个组织样品，以内标物这一峰值来缩放，可以比较实验中所有频谱。

注 16：将被保存进波谱基部的有效波谱位于列表的顶端。使用对应该波谱的样品名。在保存有效波谱后，重要的一点是在输入列表的下一样品名之前，先关闭这一波谱。这一程序使所有数据集能以同样方式按比例缩放，只需要输入不同的样品名。若需要整个过程自动操作，可利用 NMR 数据收集使用的实验样品列表编写一个单独的子程序。对于小型实验集则无此必要。

注 17：在样品组织具可变性的数据集里（如水分或淀粉含量），按总强度缩放比按参考区域缩放有时候更有用。

注 18：建议的多变量分析的一系列步骤并不详尽。统计数据分析的方法依赖于所提出生物问题的性质。在许多情况下，一系列的数据模型需要建立。在所有情况下，多变量分析得出的发现可以通过使用 AMIX 检查原始的 NMR 数据库来检验。

注 19：当打开数据文件后，不要排除“空白或包含文本”行。这有助于样本分类和彩色编码生成图。

注 20：如果数据集的任意区域被移除，因数据点的数目可能不同，很难比较输出到文库的标准化合物。

注 21：对于一个好的模型，R^2 和 Q^2 值应尽可能接近 1。当 Q^2 值开始下降时，应该不再有成分生成。

注 22：PCA 模型中产生的分值是一种新变量，能总结 X 变量。PC1 和 PC2 的分值相互正交且彼此完全独立。PC1 的分值解释 X 空间的最大变量，继之以 PC2 等。因此 X 空间中，PC1 对比 PC2 的散点图是一个窗口，显示 X 观察值相互之间如何坐落。邻近相互之间观察值类似，远离彼此的观察值不同。这类图谱可以表现数据中异常值、群组、相似点和其他模式的可能存在。PCA 得分图的简单示范如图 17.3 所示。该示例中的数据明显群集成 3 组。组 1 溢出至图谱的左手边，因此具有低的 PC1 值。这些样品非常不同于具有高 PC1 值的组 2 和组 3。组 2 的样品可以通过 PC2 与组 3 分离，因此组 2 的 PC2 值高于组 3。

注 23：载荷图描述的是 PCA 得分图中导致群分离的化学位移的差异。载荷图可以用二维散点图或折线图来代表。线图格式尤为有用，因为它类似于初始的 NMR 波谱，在正、负方向都有峰。来自小麦数据集的两个载荷图的示例如图 17.4 所示。PC1 载荷图描述 PCA 得分图在水平方向的分离。PC1 载荷图上的正峰代表的是位于得分图右手边的样品提高的化学位移强度。PC2 载荷图描述 PCA 得分图在垂直方向的分离。PC2 载荷图上的正峰代表的是位于得分图上部的样品提高的化学位移强度。这些总结在图 17.5 中。

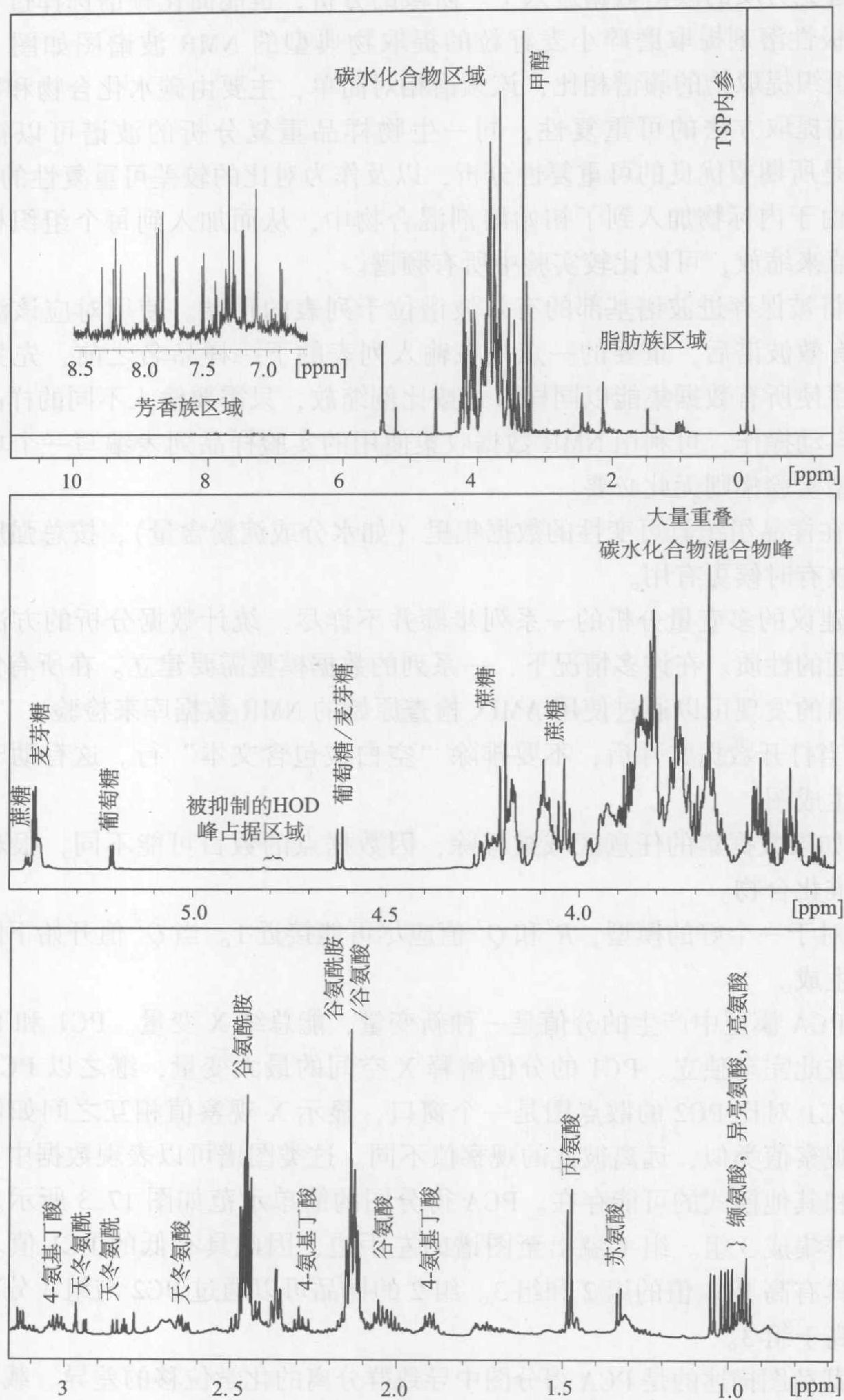


图 17.1　磨碎小麦籽粒极性溶剂提取物获得的典型 NMR 频谱。该范例是在 Bruker Avance 600 MHz 仪器上收集的。上图：嵌入扩展的芳香族区域的整个频谱；中图：扩展碳水化合物区域；下图：扩展脂肪族区域

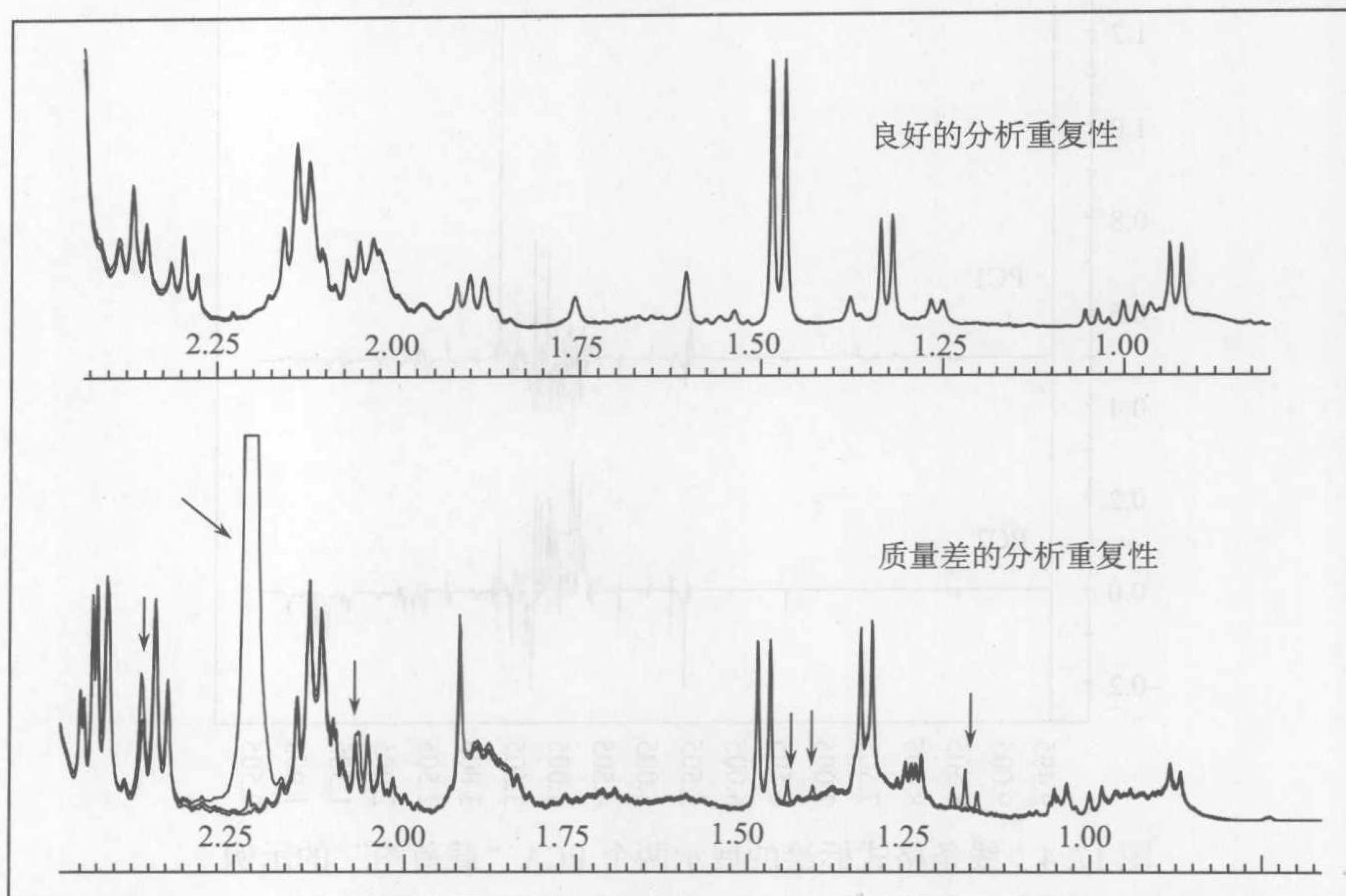


图 17.2　优劣分析重复性的 NMR 频谱的比较。每个实验图中都包含三个重叠的分析重复。下图中箭头表示重复间的差异点

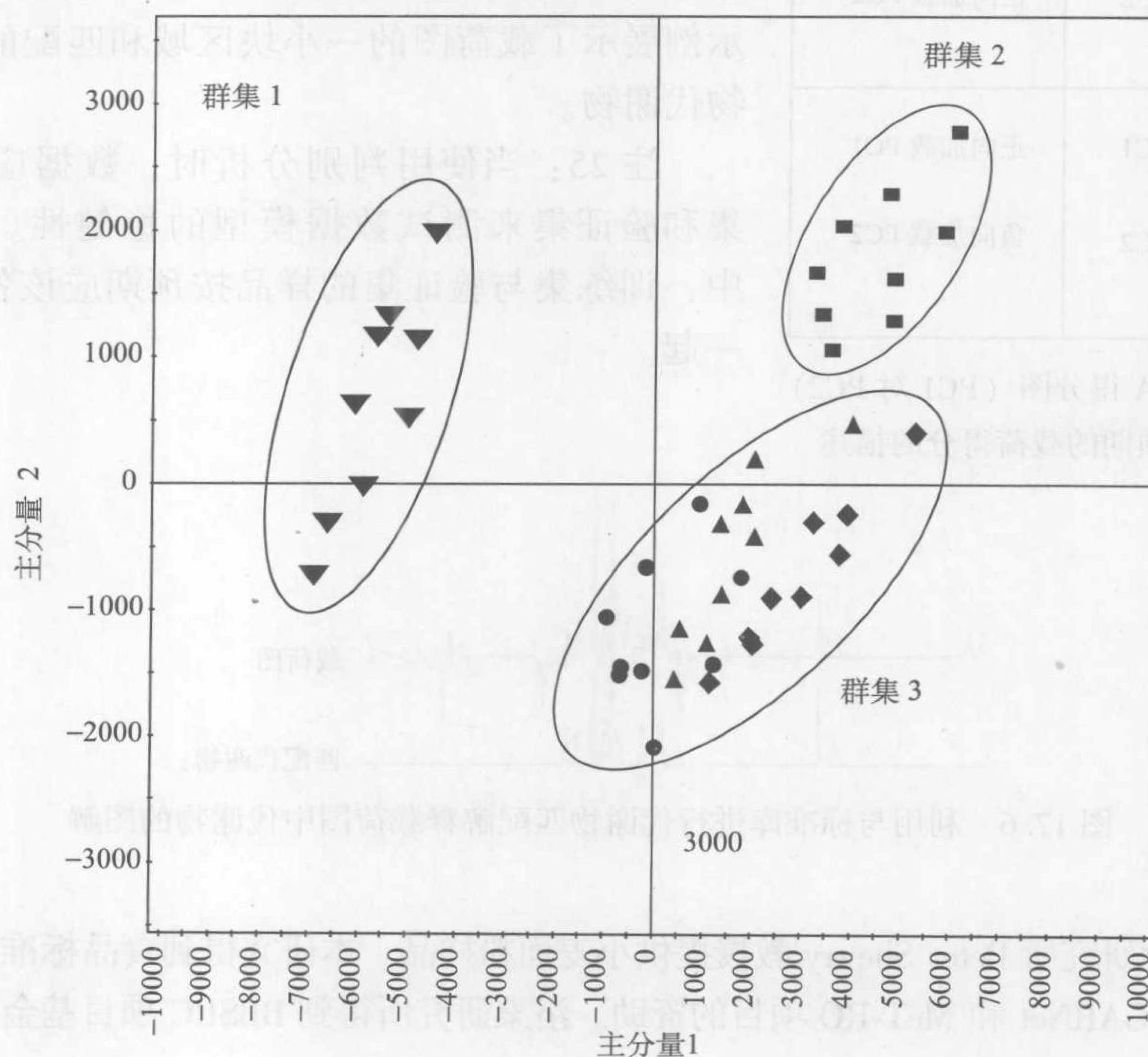


图 17.3　PCA 得分图示例，展示三个样品群集

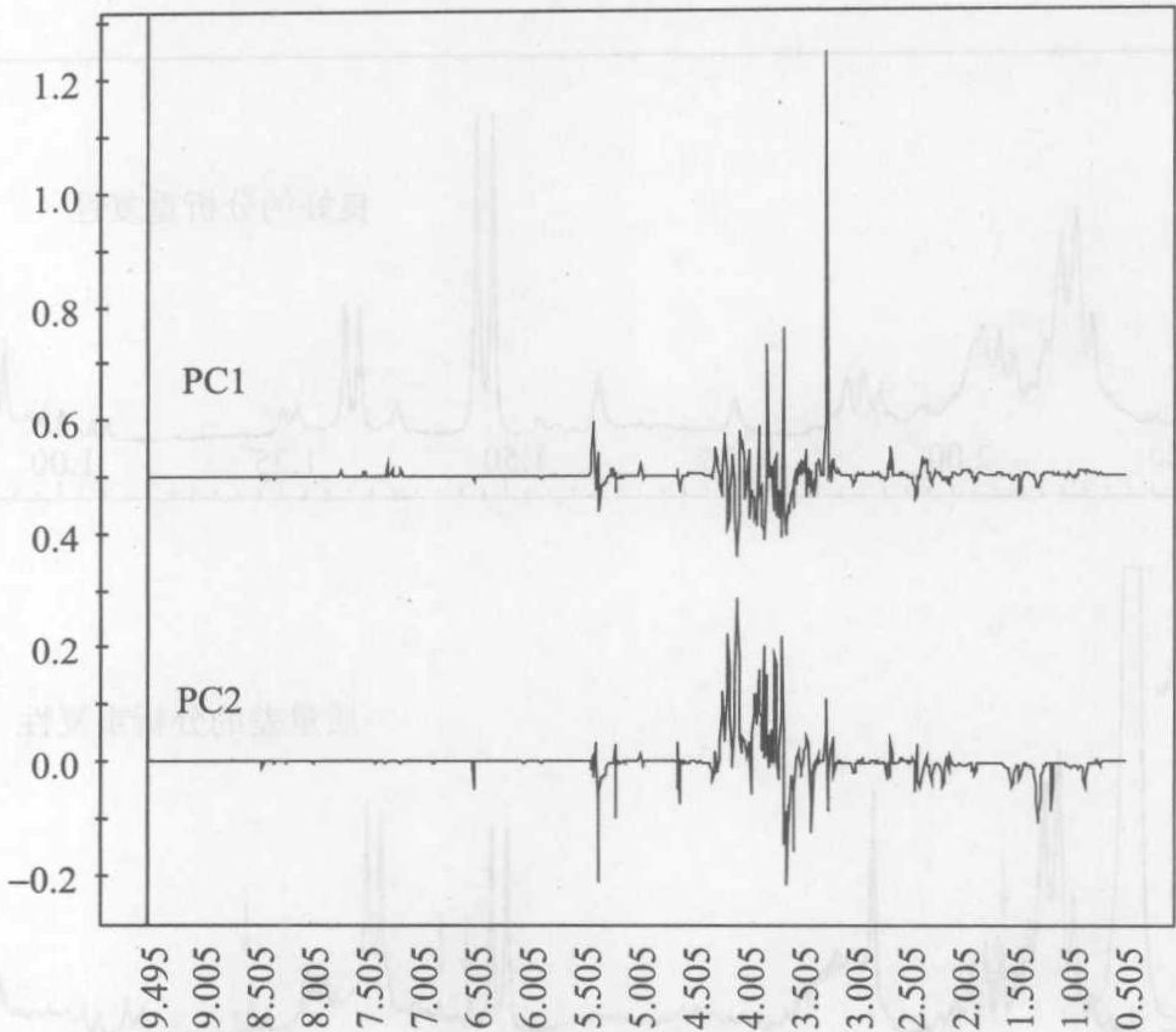


图 17.4　线条格式标绘的展示两个 PCA“载荷图”的示例

负向加载 PC1 正向加载 PC2	正向加载 PC1 正向加载 PC2
负向加载 PC1 负向加载 PC2	正向加载 PC1 负向加载 PC2

图 17.5　PCA 得分图（PC1 对 PC2）象限位置预期的载荷得分的描述

注 24：天然化合物的 NMR 频谱数据库需要建立，使载荷图的赋值得以实现。一旦数据库建立，很容易就能以载荷图为背景比较标准波谱。图 17.6 示例展示了载荷图的一小块区域和匹配的碳水化合物代谢物。

注 25：当使用判别分析时，数据应分成训练集和验证集来测试数据模型的稳健性。在得分图中，训练集与验证集的样品按预期应该各自群集在一起。

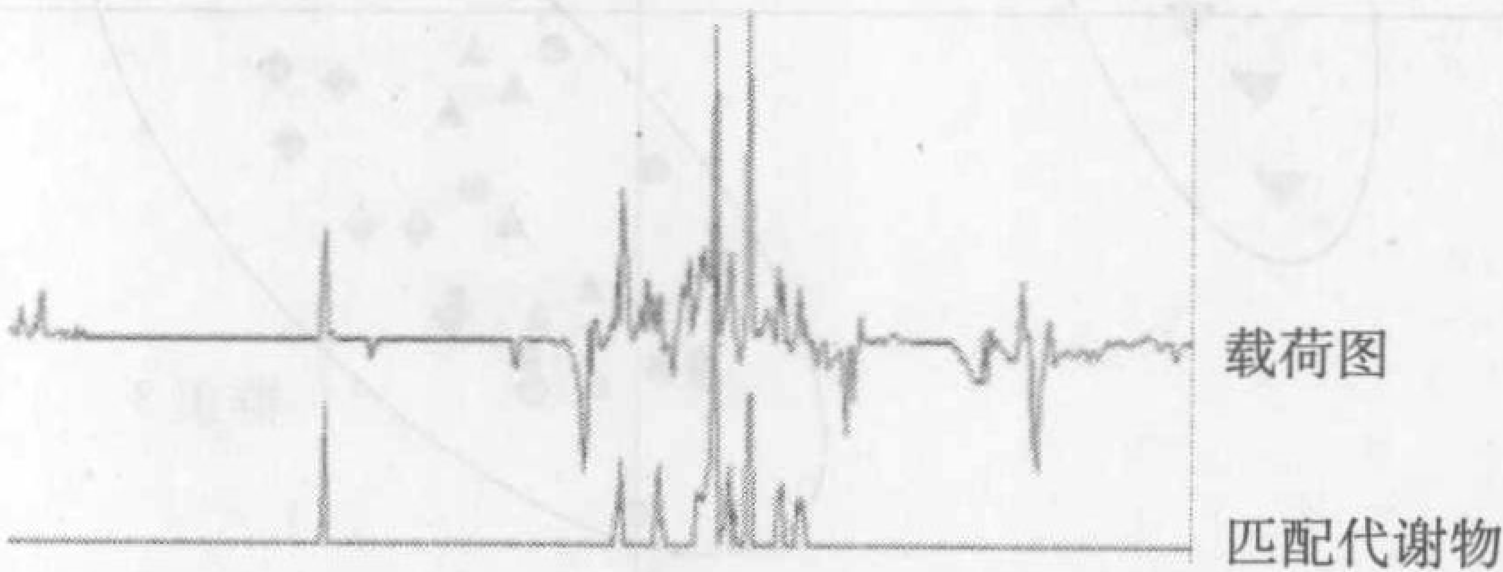


图 17.6　利用与标准库进行代谢物匹配解释载荷图中代谢物的图解

致谢

感谢洛桑研究所 Peter Shewry 教授提供小麦面粉样品。本研究得到食品标准局 G02 项目和 BBSRC 的 GARNet 和 MeT-RO 项目的资助。洛桑研究所得到 BBSRC 项目基金的支持。

（楚　璞　邓志平　译）

参考文献

1. Sumner, L. W., Mendes, P. and Dixon, R. (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817-836.
2. Catchpole, G. S., Beckmann, M., Enot, D. P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., Hardy, N., Smith, A., King, R. D., Kell, D. B., Fiehn, O. and Draper, J. (2005) Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *P. N. A. S. USA* 102, 14458-14462.
3. Baker, J. M., Hawkins, N. D., Ward, J. L., Lovegrove, A., Napier, J. A., Shewry, P. R. and Beale, M. H. (2006) A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotech. J.* 4, 381-392.
4. Defernez, M., Gunning, Y. M., Parr, A. J., Shephard, L. V. T., Davies, H. V. and Colquhoun, I. J. (2004) NMR and HPLCUV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6075-6085.
5. Manetti, C., Bianchetti, C., Casciani, L., Castro, C., Di Cocco, M. E., Miccheli, A., Motto, M., Conti, F. (2006) A metabonomic study of transgenic maize (Zea mays) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *J. Exp. Bot.* 57, 2613-2625.
6. Le Gall, G., Colquhoun, I. J., Davis, A. L., Collins, G. J. and Verhoeyen, M. E. (2003) Metabolite profiling of tomato (*Lycoperiscon esculentum*) using 1 H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2447-2456.
7. Ward, J. L., Harris, C., Lewis, J. and Beale, M. H. (2003) Assessment of 1 H-NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62, 949-957.
8. Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2001) Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Res.* 39, 1-40.

第18章　转基因作物田间试验的设计与管理

Zoltán Bedö　Mariann Rakszegi　László Láng

摘　要： 随着转基因技术体系的发展，异源基因转入植物基因组已成为可能，这为植物育种家拓展遗传资源提供了一条新途径。转基因作物田间试验的设计与管理因目的不同而异。育种家分析转基因作物的基因型和表现型的稳定性，记录田间条件转基因纯合个体数的变化，并运用回交法将转化导入的基因转育到新受体基因型等。育种家还需要扩繁转基因作物，以获取足够的种子数量，分析有关性状，检验转基因系的田间表现、比较转基因材料与受体亲本之间的差异。在品种登记和释放之前，还需要开展品种的特异性、一致性和稳定性田间测定（即DUS测定）及栽培与利用评估试验（即VCU试验）。转基因作物田间试验还包括一项特殊要求，即评估可能的环境风险。依据欧盟对转基因高等植物环境释放的2003/701/EC［1］条例，特别注意监测转基因作物在大田环境下花粉的存活力和传播能力、基因转移的可能性、导入序列的表达产物的作用、基因型与表现型的不稳定性可能出现的有害效应等。

关键词： 小麦（*Triticum aestivum* L.），田间试验，转基因作物，环境风险评估

1. 引言

在过去十年中，遗传转化手段已经成为常用的拓展植物育种的遗传变异的方法之一。随着小麦的转化技术体系的发展，育种家可以获得丰富的转基因的基因型，诸如提高抗生物和非生物逆境、改良品质性状的转基因植物，其对育种家开发新的种质是很有帮助的。然而，分析外源基因对这一性状的各种表现型的影响，仍需要进行田间试验。Barro 等［2］发现在田间试验中，转基因株系与非转基因的亲本相比，在农艺性状和产量构成因子上表现出细微的差异；相反，Rakszegi 等［3］分析转基因的 B73-6-1 与其亲本非转基因的 L88-6 时，发现这两个株系间产量性状上并没有任何差异。Sharp 等［4］的结果认为，*Wsm* Ⅰ基因提供了小麦梭条花叶病毒最强的抗性，但经田间试验表明，转入该基因会导致11%~28%的减产。尽管插入的位点可能会不相同，后代的分离比例也不一定符合孟德尔基因分离比例，但转入的基因通常在 T_1 代表现为显性性状［5］。这一点正可以解释为什么在转基因的遗传学分析时，至 T_5 代还会发现杂合基因型和纯合基因型同时存在的现象［6］。

育种家可以运用田间育种方法，通过与非转基因的亲本回交，使回交后代具有与亲本相似的表型；也可将导入的基因转育至二代转基因作物基因型中。这些转基因株系都需要在大田间条件下繁殖足够数量的种子，用于详细地分析相关的目标性状。与常规育

种方法相比，转基因材料的田间测试会有某些特殊要求，如环境风险评估。本章节旨在叙述转基因小麦田间试验的管理和设计，并顾及这些的特殊要求。

2. 材料

田间试验适用于转基因育种计划的若干阶段。

2.1 候选植株的种植

候选转基因植株是指已完成遗传转化，但尚未验证的植株（T_0 代），一般种植于封闭的温室中。但当日常的育种试验需要大量的株系时，也可以采用田间试验。

2.2 $T_1 \sim T_n$ 代转基因株系的种植

为了获得稳定的纯合个体，需将不同世代的转化植株种植于田间的育种圃。经对转基因植株的基因分离和基因沉默的检测后，验证的转化株最好种植在穗行试验区。在一些特例中，可用单粒传法（single seed descent，SSD）进行世代的加代，但这项技术一般只限于在温室中操作。如果研究目标是创建新的遗传种质，或者是培育转基因新品种的话，那么导入的外源基因的整合和遗传必须是稳定的。

2.3 转育的群体和株系的测定

培育回交（BC）后代是将导入的基因转入非转基因材料的重要育种方法，尤其对组培再生能力差、转化频率低的回交亲本更为重要。运用这一方法时，可选用再生能力好但育种价值不高的基因型作为转基因受体。回交法仅用于促使转基因株系与它们非转基因的原始亲本的性状趋于一致［7］。

2.4 农艺性状表现的检测

利用纯合后代的群体，如 T_4 代或更高世代，可以测定所培育的转基因系的农艺性状和抗性的表现。测定在各种环境下转基因系与非转基因的原始亲本的表型反应，明确转基因系的适应性和抗性机理。在这个试验中，需要在田间条件下鉴定转基因系对赤霉病的抗病反应，原因是田间的病原菌致病性往往比温室环境强［8］。

2.5 纯合转基因系作为商业化品种登记所需的检测

需要对纯合转基因系进行 DUS 测定和 VCU 评价，以符合国际植物新品种保护联盟 UPOV 的规定。

3. 方法

3.1 释放试验的地理位置要求

释放地点应是宜于种植该作物的一个隔离区，其动植物区系与周围农田没有差别，

而且没有稀有或受保护的植物或动物物种，也必须确保释放地点较远的区域没有政府机构认定的群落生境或保护区。试验区要求地势平坦，既要能减少基因逃逸的危险，又要便于耕作，使试验尽可能地精确，尽量减小试验误差。

3.2 试验管理的说明

3.2.1 试验田的准备

试验区根据所栽培作物的常规操作准备试验田，精心挑选能够及时收获并无前茬残留物的田块，以确保苗床优质，因为残留在土表的秸秆和根须很容易缠绕在小区播种机的犁刀上，使小区试验难以实现精确。小面积的转基因试验不应该在以前做常规试验的小区试验田上进行。

3.2.2 施肥

肥料应按常规耕种和生产要求施用。化肥用量多少需考虑转基因植株的株高，由于高秆的转基因植株容易倒伏，氮肥的施用量应比正常的用量略少。小面积田间试验不应施用有机肥，以免造成土壤养分的不均匀。

3.2.3 土壤消毒

这项措施仅限于可能有病虫草害危害时，并且只有当这种处理不会对试验目的有影响时才能使用。

3.2.4 试验的设计与准备

开展试验的第一步是制订试验方案，确定待测试的基因型及其在试验设计中的布局，设定试验区的大小、重复的次数和试验方案等。按播种清单准备试验种子，清单包括详细的试验代码、每个区的编码和种子的来源（哪个试验的哪一个试验区）。此外，品种名称和基因型的谱系，或其他标识性数据通常也要包括在内。对于某些类型的试验，播种清单还要标注每个小区播种的行数和播种的种子数量。

3.2.5 种子准备

如何准备试验种子，取决于转基因的世代高低；也取决于测试的基因型是直接转化获得的，还是用转基因材料培育的；以及所能提供的种子数量多少等因素。上一世代入选的穗子，用单穗脱粒机脱粒，也可以人工脱粒，要将脱粒的种子存放于专门的容器。所有的种子按播种清单依次排序。如果有必要，还要对种子进行清选，清选时应选用可避免不同基因型混杂的实验用种子清选机。如果有需要也可以对种子进行包衣，并按每个小区的播种数量分装入小袋子。播种前，准备好的种子应与其他试验材料分开单独保存。当脱粒、清选、包衣和计数完成后，实验设施和房间需要彻底地清洗，任何多余的种子和其他的植物组织要收集好并销毁。

3.2.6　播种

如果只有少量的种子，如 T_1 代和 F_1 代，可用手工宽距播种，也可用单粒种子播种机播种。对高世代的种子，如 T_2、T_n 或回交转育的分离群体，单穗脱粒的种子在下一代单独播种成穗行。单粒传（SSD）方法很少用于田间试验的加代。转基因纯合的群体，常用一种特制的试验用小区播种机或穗行播种机播种成小小区。这些机器设计独特，能把手动或自动装入的所有种子在设定的距离内全部播种完。播种的密度可以通过改变种子的数量或播种距离来调整。这样，田间连续播种的种子不会混杂，播种后机器也不需要清洗。播种机在播种后会进行覆土和压土等，这样播种后不必再一次耕作。

3.2.7　转基因田间试验的隔离

转基因植株四周至少应该种植 2 m 宽的常规小麦品种，且有至少 20 m 宽的空闲农田或非禾谷类作物区。待试验中最迟的材料开花后，转基因小麦与常规小麦再也没有相互杂交的风险时，这 2 m 宽的保护行小麦植株可以销毁。

3.2.8　传病的边行

如果田间试验目的是为了鉴定转基因系对真菌的抗病性，为了便于人工接种的诱发，边行必须种植由感病基因型组成的材料。在鉴定小种专化型病害或虫害的试验中，边行要混合种植多种基因型的材料。用实验室培养的菌种直接接种转基因植株是鉴定抗性的另一种方法［3］，这一方法需对转基因的部分植株或每一小区的一行进行接种。

3.2.9　杂草控制与病虫害的防治

当作物出苗后，要对小区两端边界的苗进行修整，以形成最终小区的大小。这项操作可以用手工完成，也可以用旋耕机修整，或者喷施广谱除草剂。每个小区用塑料标签标示，标签用热敏打印机打印并固定在标牌杆上。标签上需包含本小区的识别信息或其他相关信息，标签内容既要肉眼可辨，又能被条码机识别。当同时收获许多小区时，小区的标签可取下粘贴在包装种子的纸袋或布袋上，确保在整个试验过程中小区的编号不会搞错。如果试验地气候适宜的话，建议播种后立即喷施苗前除草剂，对其极易发生草害的稀播小区尤为重要。对于禾本科杂草和阔叶杂草，采用常用的控草措施，并充分关注当地杂草群落中的优势草种。如果试验没有特别要求，允许使用杀菌剂和杀虫剂进行病虫害的防治。在成熟前，用网遮盖小区，以防鸟类传播种子。

3.2.10　灌水

通常小麦不需要浇水。唯一的例外是，为了保证转基因植株在干旱条件下能存活，才进行浇水。在检定转基因植株的抗病性时，也可能需要对试验田进行浇水以

促进发病。对某些人工接种试验，如接种小麦赤霉病菌（*Fusarium*），也可以利用浇水来保证田间高湿环境。在测试干旱和高温逆境效应时，也需要对浇水与非浇水区进行对比试验。

3.2.11 考察与记载

根据试验设计编排田间记载本，用于记录田间采集的数据。记载本除了记载本次试验的样本编号等信息外，还应该包括以前相关试验中所有的观察记录和措施。按照试验方案，在整个生长季节定期考察各试验点，记录表型数据，并与非转基因的标准值进行比较。观察转基因小麦对生物逆境抗性的表现型反应，一旦观测到感染，应该立即记载。

3.2.12 收获

根据试验的需要，或者选用小区试验收割机收获整个小区，或者对转基因株系进行单穗选择。收获的籽粒装入纸袋或布袋，并贴上相应的标签确保种子和编号准确无误。用于标识小区的标签，也可用作收获时的种子标签。装有种子的纸袋或布袋，应放入封盖的盒子或容器中，以防种子在路途中撒落。转基因小麦应该与非转基因的材料分开单独储藏，并清晰地一一标注。繁殖获得的数量和已使用种子的数量都要准确记录。为防止机械混杂，在离开试验区前，应对收割机进行彻底地清理，确保没有任何种子或穗子残留在收割台、滚筒和滤筛上。散落的种子在土壤中自然发芽可能是转基因小麦与常规小麦间产生机械混杂的一个原因，因此，应在收获中尽量减少撒落，努力确保麦穗不要遗留于田间。

3.2.13 收获后处理

遗落田间的残留植物材料必须取走或耕入土壤中。通过观察遗落种子的发芽情况来决定翻地和耕种的时间。对遗落而萌发的种子，采用喷洒相应的除草剂或者通过翻耕来去除。下一年，这块地不能再种植农作物，第三年可种植非禾谷类农作物，或者让土地闲置。

3.2.14 应急措施

在试验中，万一发生最不愿意看到的意外，或者植株发生扩散等事故时，必须立即去除或销毁所有的植株材料，任何遗留的材料都要耕入土壤中。如果有必要的话，还要对小区和小区周围 2 m 左右的区域喷施相应的除草剂。同时，必须对该区域的复种情况进行监测。

3.3 作物田间试验的环境风险评估

风险评估是转基因作物田间试验管理的重要组成部分。特别要关注基因转移的风险，一是关注通过花粉进入其他作物，或者从植物进入土壤的细菌中；二是关注目的基因或标记基因对其他生物体的影响。因为小麦是自花授粉作物，所以基因转移的概率似

乎并不大。同样，至今没有因导入序列的产物而发生负面影响的报道。不过，仍需要评估发生有害影响的潜在概率，时刻关注周围的环境状况。

3.3.1 存活、扩散和传播的能力

小麦是一年生植物，所以它只能通过生产籽粒而延续后代。春小麦通常是3月播种，7月或8月收获；而冬小麦播种期因地区而异，常在9月至11月下旬播种，成熟期一般比春小麦早10~15天。提早收获能尽量减少因动物或鸟类叼食种子或麦穗而传播材料。可是，成熟的麦粒在收获前或收获期间会掉落到地面，其可能捱过冬天，在来年春天发芽生长。收获后要烧毁秸秆，田间的任何植物残留物需翻耕入土。转基因编码的蛋白质及其作用产生的新组分，在土壤微生物的代谢作用下会被迅速降解。

收获后，掉落的籽粒在割除麦茬后会露出来，可以通过再一次的耕种作业将这些籽粒翻入土壤中，使它们不能长期地存活。通过对田块喷施除草剂、去除所有任何再生苗等处理，可以将遗留籽粒存活的概率降到最低。建议在收获和去除植物残留物后的10天内，对环境释放试验地喷施浓度为3 L/hm^2 草甘膦除草剂。如果有必要的话，可以喷施两次除草剂。下一年，对试验区定期监测，如果发现有任何发芽的小麦，必须手工拔除并烧毁。土壤的温度也会影响籽粒的存活能力。例如，对春小麦而言，冬季的霜冻会极大地降低遗留籽粒的存活能力。

3.3.2 基因通过花粉转入其他小麦植株的可能性

在自然条件下小麦的自花授粉超过99 %，所以转基因株系与其他小麦品种发生天然杂交的概率非常小。小麦的花粉粒比较重，正常情况下被风刮起后，它们存活的距离不会超过5~10 m，存活时间也只有1~3 min，所以，只有在极端天气条件下才会发生异交授粉，且最多在10~20 m的距离之内。

3.3.3 基因通过花粉转入其他物种的可能

有人担心转化的作物可能成为无法控制的杂草，转移的基因还将扩散到杂草等类似的野生物种中，从而形成极其顽固的杂草，即所谓的“超级杂草”。尽管大多数作物在多数的种植区域并没有发生与近缘种杂交产生后代，但是一直有人因为导入的基因有可能传播到杂草上，因而建议禁止所有的转基因作物。

若小麦与相关的野生种，如山羊草（*Aegilops*）、冰草（*Agropyron*）、黑麦草（*Secale*）、大麦（*Hordeum*）、披碱草（*Elymus*）同时开花，发生天然杂交的概率也非常小（大约1%）。至今，还没有任何报道发现小麦与野生种天然产生的杂交植株，而且如果可能有任何这种杂交后代的话，它们要么是不育的，要么存活力非常低。确保实验区50 m内没有与栽培品种相关的植物，也能最大限度地减少异花授粉的可能性。尤其是能与小麦杂交的栽培黑麦，不得在试验地点的附近区域种植。

3.3.4 基因转入微生物或动物的可能

在自然条件下，基因水平地从植物转移到土壤细菌或肠道细菌中的风险是非常低

的。与细菌中基因发生自然突变相比，如自发产生氨苄青霉素的抗性突变，基因转移对人类健康的风险是微乎其微的。编码β-葡萄糖苷酸酶（GUS）的 *uidA* 基因常常被用作遗传转化的标记基因，该基因也广泛存在于微生物中。用于转化试验的质粒载体，往往携有氨苄青霉素抗性基因，由于该抗性基因受原核生物的启动子调控，在转基因植株中不能表达，且这种基因也存在于土壤细菌中。万一有氨苄青霉素抗性基因水平转入土壤细菌中这种极端事件发生，被转化的土壤细菌只有在添加相应的抗生素的土壤环境中才具有选择优势。

3.3.5　导入序列表达产物的影响

必须关注目的基因产物可能导致的风险，但是，基因转移最大的风险还是来自于选择性标记基因的产物。抗除草剂或抗生素等选择性标记基因并不是转基因植株所需要的基因，因此，目前研究的重点是研发新技术，去除转基因植株中的选择性标记基因。通过常规的基因分离方法，可以实现去除选择性标记基因［9］，但是，人们更看好同源重组法去除标记基因。多元自主转化（multiauto-transformation，MAT）载体系统正是应这一目的发展起来的，它只需简单一步就可以获得无标记基因的转基因植株［10］。然而，无论是对小麦还是环境中的其他生物，目前没有报道转基因作物因导入序列而产生潜在的有害产物。

3.3.6　表现型与基因型的稳定性

组织培养和转化试验可能产生与转基因效应无关的表型效应，而且这种表型效应理论上会对田间试验产生影响。因此，田间释放试验的所有转基因株系，都应选用表型上与对照相似的植株，以避免表型效应的影响。

变异也可能由外源基因的不稳定引起，当发现转基因植株出现发育异常时，育种家需要采用与其亲本回交的方法，从而选获表型上与被转化的亲本相似的株系。因此，所有的入选田间试验的株系，应当通过若干世代种植，获得遗传稳定的株系。

3.3.7　对非靶标生物的有害效应

小麦对人类或其他物种通常不是致病源，转化植株的致病性，或其对人类和其他生物的影响，不会与其亲本或对照品种之间有不同表现。过敏人群食用小麦制品可能导致某些不良反应，如过敏反应、面筋的不耐受反应导致的腹腔疾病（coeliac disease）和疱疹性皮炎（dermatitis herpetiformis）等，而面包师哮喘（baker's asthma）等呼吸过敏可能是由于吸入面粉所引起的。同样，小麦面粉可能导致枯草热过敏（hay fever allergy）。然而，没有任何证据表明，在转基因小麦中这些有害效应会更加严重。根据我们的经验，转基因小麦的各种有害效应与其对照或非转基因植株的表现是一样的。

4. 小结

转基因释放的法律条件：转基因植物释放到环境中，如田间试验需要特别的许可证。在大多数国家，特别是欧盟成员国，许可证只能由基因技术权威部门发放给有资质的责任单位，他们具备开展转基因释放试验相应的设施与条件。环境释放许可证准许在特定的生物体（如物种、品种等）和特定的基因插入事件中，在规定的释放条件下、限定的期限内开展试验。这些特殊要求是根据欧盟条例 2003/701/EC［1］中对高等植物转基因环境释放的法律条文制定的。

（王建军　译）

参考文献

1. EU Directive 2003/701/EC. Commission decision of 29 September 2003. Establishing pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council a format for presenting the results of the deliberate release into the environment of genetically modified higher plants for purposes other than placing on the market. (notified under document number C (2003) 3405).
2. Barro, F., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Shewry, P. R., Martin, A. and Ballesteros, J. (2003) Functional properties and agronomic performance of transgenic *Tritordeum* expressing high molecular weight glutenin subunit genes 1Ax1 and 1Dx5. *J. Cereal Sci.* 37, 65-70.
3. Rakszegi, M., Békés, F., Láng, L., Tamás, L., Shewry, P. R. and Bed?, Z. (2005) Technological quality of transgenic wheat expressing an increased amount of a HMW subunit of glutenin. *J. Cereal Sci.* 42, 15-23.
4. Sharp, G. L., Martin, J. M., Lanning, S. P., Blake, N. K., Brey, C. W., Sivamani, E., Qu, R. and Talbert, L. E. (2002) Field evaluation of transgenic and classical sources of wheat streak mosaic virus resistance. *Crop Sci.* 42, 105-110.
5. Lrz, H., Becker, D. and Lutticke, S. (1998) Molecular wheat breeding by direct gene transfer. *Euphytica* 100, 219-223.
6. Rooke, L., Steele, S. H., Barcelo, P., Shewry, P. R. and Lazzeri, P. A. (2003) Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. *Euphytica* 129, 301-309.
7. Barro, F., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Shewry, P. R., Martin, A. and Ballesteros, J. (2002) Field evaluation and agronomic performance of transgenic wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105, 980-984.
8. Anand, A., Zhou, T., Trick, H. N., Gill, B. S., Bockus, W. W. and Muthukrishnan, S. (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *J. Exp. Bot.* 54, 1101-1111.
9. Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transform-ants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.
10. Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E., Endo, S., Yamada, K. and Komamine, (2001) Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep.* 20, 383-392.

第19章　遗传修饰（转基因）风险评估

Penny A. C. Sparrow

摘　要：转基因风险评估对于相关的法规、通告和准则的决策过程起着重要作用。转基因风险评估最基本的作用之一是确保安全处理和控制转基因生物；另一个作用是评估对环境和人类健康存在的任何潜在影响。风险评估应该在科学的基础上回答所有“如果”情况下的影响因素。

本章提供给广大科研人员有益的指南，帮助他们开展转基因生物风险评估工作。尽管我们参考的是英国和欧盟的法规，但是考虑到的基本原则和要点，适用于大部分国家。

关键词：转基因，风险评估，封闭式应用，田间释放

1. 引言

通常看来，首次撰写转基因风险评估（GMRA）报告是一项艰巨的任务。你去哪里寻求帮助呢？你懂得相关的术语吗？你了解作物的生物学特性和其与野生亲缘种的亲和性吗？幸运的是，手头上已经有许多可用的资源，如果你知道去哪里查找，就会发现大量繁重的工作已经完成。本章提供了关于如何编写您自己的GMRA的一步一步的指导，同时指出目前可用的大量资源，再加上一些方便的技巧，使你的撰写任务变得更为容易。

转基因生物法规可以分为两部分：①封闭式应用；②有条件环境释放（非限制应用）。以上两部分，转基因风险评估（GMRA）所要考虑的因素是相似的。但是，第二部分所需的支持信息，对深度和细节的要求将远远大于第一部分。首先让我们来看看转基因生物在封闭条件下的应用。

2. 转基因植物的封闭条件下应用

限制范围包括实验室中转基因生物的初始形成，此外也包括转基因生物的使用、储存、运输和销毁。典型的封闭使用包括实验室、温室和封闭的工厂化生产设施内的工作（见注1）。限制的转基因生物不包括有条件释放到环境中进行试验的转基因生物，或者投放到市场中的转基因产品。

针对转基因微生物封闭条件下应用，根据欧洲共同体指令（见注2）条款，所有计划生产或处理转基因生物的组织，在第一次生产或处理封闭应用的转基因生物时，必须

将他们的使用意图告知有关主管机关（见注3）。例如，在英国，英国健康与安全执行局（www. hse. gov. uk）是主管机关。在进行转基因工作过程中，法律要求任何研究所都要有一个“转基因安全委员会”。如果你在某个单位从事转基因工作，并且这个机构在做类似的工作，你应该和其转基因安全委员会成员联系，获取一份标准格式的转基因风险评估表，该表通常由单位编制，要求从事转基因工作人员填写（见2.1节开始部分）。然后该研究所转基因安全委员会负责审核，要求委员会成员一致认为该风险评估是适当和足够的，并且选定适当防护控制等级以期将任何潜在的风险降低到忽略不计或很低。然后将转基因风险评估内容放置于内部网——这种方式可能获得有用的参考意见（或者事件范本），从而可以了解到转基因风险评估还需要哪方面的信息。在转基因植物领域，目前还没有标准的控制等级。根据转基因植物本身的性质，简单地归类为“须申报的”或“不须申报的”。

须申报的转基因植物活动包括与未转基因植物受体相比，转基因植物对人类健康构成更大风险的情形（见注4）。在准备开展该工作时，要求提前45天通知有关主管部门。相反，不须申报的是指转基因植物相对其受体，不会对人类健康构成较大的风险。

转基因生物限制应用所产生的风险程度，取决于对限制环境内所产生的潜在有害影响，或者这些潜在影响产生时，对人类健康构成风险。在实施过程中，风险评估也需要考虑转基因生物对人或环境的暴露，或者从控制应用的环境设施中意外泄漏的可能性。

针对控制应用的转基因生物，典型的风险评估需包括以下几点：

（1）项目基本信息；

（2）环境保护的风险评估；

（3）人类健康和安全风险评估。

2.1　基本信息

2.1.1　工作说明

这部分应包含简要的项目目标介绍和承担项目的框架概要（包括获得和评估转基因生物两个部分）。需要提供有关宿主生物体、插入基因和使用载体的全部资料［通常是通用的资料，的确是值得写一份转基因风险评估（GMRA），这些资料信息将包括一个组的所有工作，如包括所有转基因小麦相关工作的信息］（见注5）。

2.1.2　工作人员的姓名、职位和背景

需要确定项目负责人，而且还要提供项目成员姓名以及项目全体成员的详细背景介绍（3.3节步骤1，见注12）。

2.2　对环境保护的风险评估

2.2.1　风险识别

风险识别是通过比较转基因植物及其受体而作出的判断，同时还要考虑和满足以下几点。

(1) 转基因植物的生存能力、种群繁殖能力、传播能力、竞争和/或取代其他植物的能力如何？考虑到可能与潜在的接收环境发生的相互作用，以及可能的修饰效果，这些生物方面都应该确定（见注6）。例如，在自然环境中，转基因植物是否更具有入侵能力？在农业生态环境中，转基因植物是否需要不同的管理控制策略？它们是否表现出不同的生存特点？

(2) 转基因植物对动物有哪些潜在的危害？例如，转基因植物是否对目标生物（如害虫）有毒，或对非目标物种（如昆虫天敌）有害？

(3) 转基因植物对有益微生物造成哪些潜在的危害？例如，根系分泌物或植物分解产物是否对微生物有潜在的危害？

(4) 转基因植物与植物病原菌间的互作可能表现出哪些不同？如果发生这种可能性，可能造成什么危害？例如，来自植物病毒的序列插入后，这些继发感染病毒重组能否产生一种新的病原体？转基因植物是否将成为一种植物病原体的新寄主，从而创造出全新的生存环境？

(5) 哪些是转基因植物的遗传物质转移到其他生物体的潜在能力，从而将上述(1)～(4)的潜在危害带给这些生物体？例如，转基因植物是否与其生长环境中的其他植物有亲和性，能够与之杂交授粉产生后代？

2.2.2 可能性评估

假设使用最基本的隔离等级，针对每一种判定的风险所表现出的危害可能性，应判定为“高”、“中等”、“低”或“忽略不计”，并且给予理由说明。

2.2.3 结论性评估

对于每种危害，一旦对生存环境造成后果，应该使用“严重”、“中等”、“低”或“忽略不计”术语表示，并且给予理由说明。

2.2.4 初步确定对环境的风险

对于每种危害，其风险水平要根据结论性（假设暴露量）或者可能性确定（假设A水平的含量）。表达为“高”、“中等”、“低”或“接近零”。

2.2.5 控制风险对环境影响的隔离措施

如果在2.2节步骤4初步的风险判定为“低”或“接近零”，级别为A的隔离措施是适当的。如果风险程度为“中等”或“高”，应该采用进一步的级别为B的隔离措施。需要描述相关设备以及控制危害的隔离措施（例如，如果需要空气过滤器，需具体说明过滤效率）。

2.2.6 对环境风险的最终判定

假设2.2节步骤5控制措施到位，针对每种危害重新评估风险级别。控制措施应当与风险级别为“低”或“接近于零”一致。

2.3　对人类健康与安全的风险评估

2.3.1　风险判定

假定人体会有暴露，当转基因植物与其亲本进行比较时，应考虑以下几点，同时判定任何潜在危害。

什么是转基因植物的潜在性危害：

（1）转基因植物比其亲本植株对人类更有毒性；

（2）转基因植物比其亲本植株对人类更过敏；

（3）转基因植物与亲本植株相比较，对人类表现出其他潜在危害。

基于以上描述，任何判定的危害都需要逐项列在风险评估里面。

2.3.2　可能性评估

假设 2.2 节步骤 5 中所指出的隔离措施已到位，显露风险的可能性应表述为“高”、“中等”、“低”或“忽略不计”，并且给予理由说明。

2.3.3　结论性评估

假设人体有暴露的情况下，需要对每一种危害产生的后果作出描述，后果的严重程度应用“严重”、“中等”、“低”或“忽略不计”来表示。

2.3.4　确定风险

对于每种危害，通过结论性（假设暴露发生）和可能性（假设措施罗列在 2.2 节步骤 5）的结合，判定风险等级。风险表达为“高”、“中等”、“低”或“接近于零”。

2.3.5　控制危害人类健康的隔离措施

如果在 2.3 节步骤 4 中的风险判定为“低”或“接近于零”时，那在 2.2 节第 5 步描述的隔离措施就是足够的。如果是其他风险级别，需要采用进一步的隔离措施将风险减少到“低”或“接近于零”。提议的设施和隔离措施应给予描述，同时这些设施和隔离措施对风险判定产生怎样的影响，也需要给予说明。

3. 慎重向环境释放

未经事先批准的转基因植物是不能够释放到环境中去的。在欧洲，2001/18 号欧盟指令（见注 7）专门规定了慎重向环境中释放转基因植物。该指令涵盖了两种类型的环境释放：实验释放（B 部分）和投放市场的商业释放（C 部分）（见注 8）。对于每个授权的 B 释放和 C 释放，国家权威机构需要向欧洲委员会提供一份告知关键信息的摘要报告书（格式化的报告书摘要，SNIF）。然后将该摘要（SNIF）文件公布于众，征求意见（http://gmoinfo.jrc.it）（见注 9）。

公共研究及管理论坛（PRRI，www. Pubresreg. org）对转基因风险评估提供了全面的指南（见注 10）。如下是对部分指南文件的概要（见 3. 1~3. 5 节）。这份指南为转基因风险书撰写提供了出色的模板和可靠的信息，所以强烈建议撰写者查阅此指南。

3. 1　试验性释放（田间试验）

申请者必须提交一份田间试验申请书，这份申请书需要提交给实施田间试验的地方会员国的国家级权威机构（见注 11）。申请书所附文件需证明田间试验不会危及环境和周围的生态系统。无论转基因生物对人类和环境是否立即造成或延迟造成危害，报告书中必须包括评价可预见风险所需要的技术材料汇编（见注 11）。一份报告书需要有以下内容：

（1）转基因生物（如受体生物、详细的修饰方式和新特点）。

（2）拟议的释放和接收环境。

（3）转基因生物和环境之间的相互作用。

（4）控制释放的监测制度和程序。

（5）从申请利用的角度，一份评价转基因生物对人类健康和环境造成危害及风险的陈述。

会员国的主管机关收到报告书后，负责审查报告书是否遵守指令，同时评估释放所带来的风险。报告书所提供的信息应足以使主管机构作出决定，同时进一步的信息和解释也需准备好，以备不时之需。主管机关必须在收到报告书后 90 天之内作出他们的决定，在这段时间内，其他会员国收到报告书后也会反馈评论。报告书批准与否是建立在转基因生物对人类健康和环境安全的基础之上的。除此之外，没有其他准则可作为决策过程中的标准。只有收到权威机构书面允许通知后，以及符合正式批准文件的所有条件后，田间试验性释放才可以实施。

3. 2　欧盟市场的转基因生物

报告书中 C 部分是有关投放转基因生物到欧盟市场的规范，转基因生物产品首先投放到哪个成员国的市场上，此报告书就必须提交到该成员国所属的权威机构。除 B 部分释放所需要的信息外，投放转基因生物到欧盟市场上还需要以下附加信息：

（1）附加信息中需要考虑产品应用地点的多样性，包括从研究中获得的信息和在实施第二部分批准文件释放过程中获得的信息。

（2）转基因产品应用可能对生态系统影响的信息，以及对人类健康和环境风险的评估。

（3）投放转基因生物产品到市场的条件，包括使用条件、处理条件和对包装及标签的提议。

主管机构审查报告书，并在收到报告书后的 90 天内给出意见。如果该意见是赞同，主管机构的领导将材料汇编转给欧盟委员会。欧盟委员会将材料汇编传递给其他成员国，并规定其他成员国在 60 天内详细评估申请书，评估过程中需要考虑到自身地域内特殊的健康和环境安全问题。如果没有异议，主管机构领导将发给申请者适用于整个欧

洲共同体的营销批文。

3.3　报告书中的基本信息（试验释放和商业释放）

对报告书中基本信息的要求（规定）和报告书出台的背景信息是行政处理（审批）所必不可少的（见注12）。

总之，基本信息部分需要陈述以下问题。

3.3.1　谁提交的报告？

在大多数法律体系中，许可证可以给法人（见注13），有时也可以给自然人（即个人）。一般法律制度要求“通知/申请人”为法人，而不是研究者，法人承担释放后的责任和义务。在大多数情况下，特别是合作的科研小组提交的申请书，如果没有法人代表，那是行不通的。因此，建议提交的申请书代表一个法人实体，如大学的某个系，同时指派一名联络人。联络人可能是研究负责人或其他指定的负责人。

3.3.2　是什么、在哪里和多久？

标题一定要阐明预期活动是什么，这是非常重要的，如抗除草剂玉米隔离性田间试验。

在大多数情况下，申请书争取批准进行多年的试验，申请年限包括任何意外的延误，如持续恶劣天气。同样，田间试验往往争取多地、多点试验的许可，这样保证田间试验地点的灵活性。以上这些情况，申请者必须向主管机构报告每年田间试验的确切地点。

3.3.3　试验的目的

申请书要求通常包括一些关于“试验的目的”的问题，这些试验活动其实所指的就是转基因的目的（如抗虫），以及申请书所申请的试验目的（如生产试验）。这些试验目的不仅使决策者了解转基因目的（如抗虫，同时可以增加产量和减少杀虫剂使用），而且当决策者做最终决定时，可以帮助他们快速了解整个申请书的来龙去脉，所以是非常有益的。

3.4　申请书中技术信息

3.4.1　有关风险评估的技术信息

技术信息主要指必要的风险评估和风险管理决策的信息。只有与其直接相关的信息才需要提供或引用。

根据所涉及活动的性质，所需信息的详略程度应适当。在一个转基因生物研发的早期，信息较少，风险信息有限，所以减少暴露的隔离措施较严格。因此，小规模检测基因功能的田间试验，其对安全信息的要求少于商业释放，但是要求较高的风险管理水平。此外，由于田间试验规模普遍偏小，代表一个临时短期的环境暴露，并且是在隔离

条件下进行的，风险的可能性和结论可以分别认定为“不可能”或“极不可能”、“次要”或“边缘”。因此，虽然对于隔离田间试验的风险评估相对简单，但是风险管理起着更加重要的作用。

3.4.2 受体生物的特点

申请书中，简要介绍受体生物的特点（一个或两个段落），更详细的信息放在申请书的附件中（几页），附件包括参考资料和数据库等信息。附件中的信息应该与申请书中的信息相辅相成。

附件一般包括以下主题：

（1）受体植物的起源及分类；

（2）（作为）作物的用途；

（3）遗传学；

（4）杂草性特点，包括生存、散布、杂草化和休眠；

（5）远缘杂交的可能性——基因转移；

（6）进一步的参考书目、引用的文献和数据库。

见注 10。

3.4.3 插入基因的特点、序列及相关供体和转化系统的信息

首先，具体说明已经插入并整合到受体植物的遗传物质是什么。

一共有两种方法：

（1）转化植株中外源基因完整的分子特征已经明确，确定哪一个部分或哪些部分实际上被插入和整合到植物基因组中（见注 14）。

（2）转化植株中外源基因完整的分子特征化还没有完成，则假设完整的结构可能被整合到受体植物，风险评估在此基础上进行。

第二个选项对公共研究案例尤为重要。因为公共研究要检测许多转化子，而且释放是小规模的、隔离的田间试验。这种方法也可以使研究人员预先提交申请，甚至在实际进行转化之前就可以提交。

如果试验移到较大规模或隔离条件较差的田间，通常要求更详细的特性描述，而对无限制（商业）释放则需要全面的特性研究。

原则上，所有插入的功能基因都与风险评估有关。不管它们是“目的基因”，或是过程中的“过客”（如选择性标记），这些都和风险评估有关。带有原核启动子的基因（即不会在植物细胞中表达）也需要在风险评估中予以考虑。

一旦确定了相关的插入序列，接下来，每个插入的基因需要列出以下方面（见注 10）：

（1）名称和缩写；

（2）来源；

（3）新产生的或改变的性状（表型）及相关供体生物的性状；

（4）由此产生的基因产物和其作用方式。

3.4.4　产生的转基因生物

在某些情况下，转基因生物有关的数据可以从种植转基因生物的人工气候箱、温室和/或早期田间试验中获得。这些数据可能包含对申请书有用的信息，尤其是转基因生物和非转基因受体植物是否有不同以及两者差异程度的数据。但是，我们应该知道，相比那些生长在野外的植物，隔离空间内（如温室）生长的植物的表现是不同的。

检测和鉴定对监测和执法意义重大，可以将重点放在插入的DNA，以及由此产生的蛋白质或两者兼而有之（见注14）。

3.4.5　预期用途（如田间试验或商业用途）

市场投放与田间试验之间的主要区别是：田间试验涉及的转基因生物仍然受不同程度的控制。然而，商业生产的转基因生物市场投放后，原则上使用是不受限制的，除了特定产品使用条件有规定，如加标签或监测。

3.4.6　接收（暴露）环境

对于风险评估，接收环境的特点至关重要。

田间试验的相关特点包括以下几个方面：

（1）比较正常的成长环境和提出的田间试验环境；

（2）影响生存和分布的特殊环境因素（如气候、土壤条件）；

（3）存在的有性亲和的作物及野生近缘种。

3.5　环境风险评估

与隔离性转基因生物应用风险评估类似，风险评估方法通常遵循如下步骤，即风险判定、可能性评估、结论评估（包括基准评估）、风险预测、风险管理和整体风险考虑。这些步骤是分阶段方法的一部分：

阶段1：逐个审议插入的基因和序列。

阶段2：审议整个植物，包括可能的协同作用和插入效果，以及转基因生物的实验信息。

阶段3：审议风险管理和整体风险。

3.5.1　阶段1：逐个审议插入的基因和序列

步骤1：风险判定

收集有关插入序列的基本信息后，针对每一个风险评估中选定的基因，对其进行潜在危害和潜在的负面影响的分析。基因的自身特点和无论不利影响因素在实际释放过程中能否发生，我们都需要考虑那些合乎科学预测可能发生的、潜在不利影响的风险因素类型。可能性问题将在风险评估的下一阶段陈述。

根据个案情况，在转基因生物风险评估过程中，我们需要考虑以下潜在不利影响。

（1）毒性。侧重回答的问题是，万一这些转基因植物被人类或动物误食，植物中

插入基因/序列的表达产物是否产生毒性。

（2）致敏性。万一转基因植物被人类或动物误食，或者它们暴露于植物的某一部分，如花粉，植物中插入基因/序列的表达产物是否会引起过敏。

（3）杂草化。插入基因/序列能引发受体植物的杂草特性变化吗？遗传修饰是否使受体植物变得更加适合其农业生境、在自然生境中更具入侵能力（像外来杂草那样）？

（4）对病原体的敏感性。插入基因/序列能引起病原体易感性的变化吗？可以导致传染病传播和/或创造出新的病原体或载体汇集地吗？

（5）对非靶标生物的影响。插入基因/序列能引起对非靶标生物群体的有害影响吗？例如，间接影响非靶标昆虫的种群水平，而不是影响靶标昆虫，也可能影响食肉动物、竞争者、食草动物、传粉昆虫、共生体、寄生虫和致病菌。

（6）对靶标生物的非预期效应。插入基因/序列能引起对靶标生物不可预测的有害影响吗？如耐药性的形成。耐药性本身并非坏事，但是一旦耐药性减损，其他治疗（杀虫）方法的效果，如微生物农药喷洒，就变成了不利影响。

（7）对环境有副作用的转基因作物，插入基因/序列能否导致管理方法变换？

（8）插入基因/序列能引起对生物地球化学过程有不利的影响吗？如氮循环的变化。

（9）插入基因/序列能引起其他非预期的有害影响吗？如：

（ⅰ）抗生素耐药性基因水平转移，从而导致医用抗生素效力减弱；

（ⅱ）由于病毒序列引入植物基因组和可能发生的遗传物质重组，发展出新的病毒株。

步骤2：可能性评估

风险评估的下一步就是可能性评估。仔细审查某一特定情况，在此特定情况下，评估事件实际发生的可能性。这里要做的是对每个插入的基因或序列作每一种潜在有害影响的可能性评估。

选择用“评估”这个词语，是因为自然界发生的事件频率是不可能都清楚的。然而某些风险计算是可能的，如非目标的风险，依据“证据权重”分析法，风险发现经常是定性的。因此，在风险评估中术语“极有可能”、“可能”、“不可能”、“极不可能”、“忽略不计”或“接近于零”经常被用于表达证据权重的发现。实际上，某些插入基因或序列具有潜在有害影响的可能性，这些可能性受许多不同因素的影响，比如：

（1）插入基因的特点。例如，一个和供体生物体毒性无关的基因，是极不可能造成受体生物体具有毒性。已知一个基因产物对某种昆虫有毒，如苏云金芽孢杆菌产生的内毒素，则会对其种类相近的昆虫产生毒性。所以需要对转基因生物毒性或毒性作用的研究数据。

（2）受体生物体的特点。例如，对于不育株和没有杂交亲和近缘生物存在的地区，受体生物体与野生近缘种的远缘杂交的可能性可以忽略不计，但是在杂交亲和的野生近缘种存在的环境中，受体生物体和可育株远缘杂交是可能的。

（3）活动的特点或规模。例如，在隔离性的小规模田间试验中，本身含有“内置的”杀虫剂的转基因植物，对目标害虫以外的昆虫或其他生物体产生影响的可能性可以忽略不计，但是在大面积的商业使用过程中这种影响则是可能的。

在可能性评估不能产生明确结论的情况下，通常最好进入下一个评估步骤。下一步评估是建立在“最坏的情况”下，特定事件的发生将会在假设基础之上进行。例如，与其花费大量的时间和精力来确定某品种准确的远缘杂交频率，倒不如假设这种植物能够远缘杂交，并将会发生远缘杂交。注意力从而集中到风险评估的下一步，即这种远缘杂交可能产生的后果是什么？

步骤3：结果性评估

结果性评估这个步骤，有害影响应该已经发生。此步骤和步骤1是不同的，因为这个步骤评估在特定的形势和环境下某些影响的严重性：在一种环境下，可能不会产生显著后果，但在另一种环境下，可能会产生重大后果。此步风险评估中用到的术语有“严重的”、“中等的”、“次要的”、“微小的”。

步骤4：风险评价

针对每一个确定的潜在有害影响，下一步的风险评估工作是风险评价（见注11）。

某种特定事件发生的可能性非常低，但是所带来的后果可能很严重，导致风险依然很高。在缺乏定量描述可能性的情况下，此步骤的风险评估使用的术语有：“高”、“中等”、“低”和“忽略不计”。

3.5.2 阶段2：转基因植物“作为一个整体”来考虑

继系统的、一个一个基因的评估之后，风险评估工作更加“整体化”，将植物作为一个整体来考虑。此阶段，风险评估需要考虑：①潜在插入基因的协同效应；②转基因生物本身可用的数据，包括插入效果的数据。

（1）潜在协同效应

引入的性状能否赋予转基因植物某些特性？这些特性能否提高环境或减少环境中转基因植物的影响？某些性状的组合可能提高潜在的有害影响，而其他的组合能减少有害影响的可能性。例如，使用两种不同的*Bt*基因，有时可以用于降低靶标生物中的耐药性。在某些情况下，单个基因和其表达产物的数据足以了解潜在协同效应；但在其他情况下，可能需要更多研究。

（2）产生的转基因生物数据

在某些情况下，种植在人工气候箱、温室和/或早期田间试验得到的转基因生物有关的数据是有用的（有效的）。这些数据可能包含对手头申请书有用的信息，特别是生成的转基因生物行为与未转基因的生物母体相比有何不同或不同到何种程度，这些相关的数据都是非常有用的。

（3）可能的插入影响

在考虑因基因改造产生的可能影响时，一些系统（特别是食品安全体系）也需考虑序列插入基因内部可能造成的影响，这些插入序列可能会干扰植物体内的生长或代谢活动，这些通常被称为“插入效应”。通常，有些基因只在胁迫下表达，有时因为插入过程中植物体本身的基因被破坏，从而造成基因变化，这种变化可能直到一种特定胁迫出现的情况下才会被注意到。这些影响无法预测，但如果将转基因生物作为一个整体来看，上面提到的影响还是有可能被验证的，虽然具有一定的不确定性。

3.5.3　阶段 3：风险管理的审议和整体风险的评定

最后，如果案例所涉及的风险没有被视为“忽略不计”或“边缘”，风险评估继续到下一阶段，此阶段考虑确定的风险是否可以管理或可接受。

（1）风险管理

在这一阶段的风险评估中，需要解决的问题是，所确定的风险是否需要具体的风险管理措施。如果需要，那么风险管理的战略意义就确定了。在已确定风险管理战略的情况下，风险评估“返回”到前面的风险评估步骤中，以确定建议的风险管理策略是否充分降低风险可能性或后果。

许多不同策略适合转基因植物的风险管理，其中包括生殖隔离（去除花器官、采用距离隔离或边界行）、时间隔离（减少群体大小或应用持续时间）和/或特殊设计的形式，如雄性不育。

（2）整体风险评定

如果风险水平较低，不易检出；或者风险管理成本过高，难度太大，就要看确定的风险是否能够接受。两种情况下，风险是可以接受的：一是对人类健康和环境的风险；二是从社会经济的角度来考虑。

这就说明我们为什么要将转基因生物相关的影响环境或人类健康的任何确定的风险，与利用非转基因受体相关的风险进行比较。例如，上述介绍的引入抗虫性，可能对一些非靶标昆虫有潜在影响，但是，将这种影响与喷洒合成农药到非转基因作物的做法所产生的影响相比较，会发现对非靶标昆虫产生的影响远远大于喷洒农药对非靶标昆虫的影响。

3.6　小结

当我们考虑转基因风险评估时，经常听到的说法是“个案评估”。转基因生物风险评估中讨论的细节和主题是依据各种情形的，尽管事实的确如此，但是它仍然可以遵循科学规律，采用系统明了的方式进行风险评估，这在本文中已有概述。充分利用已有材料和信息，将会帮助你轻松、容易、全面地撰写适合自己的转基因风险评估（GMRA）。

4. 注释

注 1：塑料大棚和/或温室，植物可以在这些地方直接种植到土壤中，潜在视为精心环境释放，这种情况需要有向关主管部门递交申请书。

注 2：指令 98/81/EC 来自于指令 90/219/EEC 的修订。

注 3：在英国，主管机关是健康与安全执行局（http://www.hse.gov.uk）。然而，环境部、食品和农村事务部（Defra）、苏格兰行政院和威尔士国民大会也参与报告书的审议。

注 4：例如，一个含有病毒序列的转基因植物，在此种情况下，需要植物卫生许可

证，并且需要更高级别的隔离措施。N. B.（本氏烟）无处不在的病毒序列，如烟草花叶病毒（CMV）的 35S 启动子序列，并不需要申请书和许可证。

注 5：例如，“所做工作将包括利用农杆菌可转化态菌株（1、2 或 3 株）改造基因型/亚种 X、Y、Z，该菌株含有感兴趣的基因（植物或细菌源），同时还带有选择性标记（*npt* Ⅱ、*hpt* 等）。”

注 6：见注 9。

注 7：许多主管机构都有非常优秀的网站，可以查阅到申请书、许可证或审批手续相关的信息资料。然而，如果是第一次递交申请书，我们建议最好联系主管权威机构，解释预期的活动，并寻求申请书程序有关的指导。

注 8：B 和 C 部分之间的主要区别在于，对于研发的环境释放发展，由一个成员国作决定；而对于投放转基因生物产品到市场，需要所有成员国作出决定。决定的过程一般是通过投票的方式，解决对风险的分歧意见。在欧洲，欧洲食品标准局（EFSA）负责监管这个阶段。欧洲食品安全局负责监管所有食品和饲料的应用（指令 1829/2003/EC）；如果所有成员国尚未达成协议，欧洲食品安全局同时也对非食品和饲料的应用进行监管。

注 9：编写风险评估过中，总结报告书也是一个很好的信息来源，例如，有关玉米的总结报告书需要对玉米生物学提供很好的描述。

注 10：针对转基因生物环境释放的风险评估报告书和风险评估，公共研究及管理论坛有指南（第二版）（http://pubresreg.org/index.php? option = com_content&task = blogcategory&id = 29&ltemid = 40）。对于许多主要农作物，本指南附件Ⅰ提供有用的“作物生物学”摘要；而附件Ⅱ提供了许多常用基因的信息。这个数据库不仅包含基因识别和功能的信息，而且还含早期进行的、与这些基因相关的环境风险评估信息。

注 11：例如，在英国，这将是环境、食品和农村事务部（Defra）（http://www.defra.gov.uk /environment/gm/regulation）。

注 12：申请书中要求的详细信息可见于第 2001/18/EC 号指令的附件Ⅱ中（对欧盟），或卡塔赫纳生物安全议定书（CPB）中的附件Ⅲ。卡塔赫纳生物安全议定书是国际公认的生物安全议定书（http://www.biodiv.org/biosafety/）。

注 13：法人是一个人格化的实体，通过法人，法律允许一个群体、允许一群人像一个人那样为某项目的而行动。

注 14：标准的分子生物学技术和清单可用于分子特性的描述。可以看些例子：http://www.aphis.usda.gov/brs/international_ coord.html。

注 15：蛋白质为基础的测试方法包括：Western blot，ELISA laternal flow strip（横向流动带），磁子，蛋白质芯片。DNA 为基础的测试方法包括：Southern blot，定性 PCR，定量终点 PCR，实时荧光定量 PCR 等。

致谢

编写此章的过程中，我曾咨询过许多公共网络资源和指南。本章大量引用了来自公共网络资源和指南中的信息，并且有些部分是直接从指南中复制或全部复制过来。因

此，要特别感谢许多素未谋面的朋友，感谢他们对公共研究和管理论坛中指导说明所做出的贡献（PRRI www. pubresreg. org）；感谢健康安全执行局（HSE www. hse. gov. uk）；感谢环境释放咨询委员会提供的有用信息（ACRE - www. defra. gov. uk/Environment / acre/）。如果要更深入、全面地了解转基因生物报告书和风险评估，我建议读者们去查阅 PRRI 的网站，找到工作群组（Working Group）就会看到有关风险评估的链接，那里会发现一份 PDF 形式的指南。PRRI 指南是一份随时更新的工作文件。

（徐俊锋　译）

第五篇　总　　结

第20章　转基因麦类作物：未来前景

Jim M. Dunwell

摘　要：继玉米和水稻转基因成功之后，现已开发了高效的小麦、大麦和燕麦转基因方法。本章对这三种作物转基因研究现状进行了叙述，并运用田间试验数据资料和专利文献，评述了未来转基因材料开发与利用的前景，分析了转基因作物的一些农艺性状，还讨论了其在生物燃料和生物制药等领域的研究拓展与机遇。

关键词：转基因，遗传转化，生物燃料，生物制药

1. 引言

在过去的几年中，转基因作物的前景已被广泛评述［1，2］，本章将不再重复这些信息，而是重点讨论来自传统科学文献，以及已授权和/或正在申请的专利［3，4］的最新研究进展。此类资料可以从一些国际网站在线免费获取（http://www.uspto.gov/patft/index.html；http://www.bios.net/daisy/bios/50；http://www.surfip.gov.sg/），通过查阅相关资料评估未来转基因作物商业化趋势不失是一种极好的方法。

2. 田间试验数据资料

通过查阅转基因作物田间试验申请的相关资料，可以评估转基因作物未来优先商业化发展的时间进程和长期发展趋势。从事此类试验的每一个主要国家的网站都可在线获取这些信息。对于美国而言，通过进入生物技术信息系统（Information Systems for Biotechnology，ISB）网站（http://www.nbiap.vt.edu /cfdocs/ fieldtests1.cfm），可轻易地获取美国农业部动植物检疫局（USDA APHIS）数据。搜索2007年3月的数据库，显示共有420项小麦田间试验申请、72项大麦的申请和1项燕麦的申请（从1998年开始）。2006年1月至2007年3月间，共有28份转基因小麦的田间试验申请，表20.1是最近小麦申请的项目。表20.2是大麦田间试验申请的相关信息。欧盟依据90/220/EFC（欧共体）条例实施的实验资料，来自网站http://biotech.jrc.it/deliberate/gmo.asp提供的数据；依据2001/18/EC条例实施的最新实验数据，可以从http://gmoinfo.jrc.it/网站获得；1999年以前的资料从OECD网站获得（http://webdomino1.oecd.org/ehs/ biotrack.nsf/ by%20organism? opendatabas）。

表 20.1　美国最近小麦田间试验申请状况

编号	申请者	基因	性状
07-057-105	Kansas State	?	抗赤霉病
07-057-102	Montana State	?	籽粒硬度
07-050-104	Rutgers University	?	赤霉病
07-038-106	University of Minnesota	脂质转运蛋白	抗真菌病害
		单端孢霉烯	抗真菌病害
		葡聚糖酶	抗真菌病害
		几丁质酶和核糖体失活蛋白	抗真菌病害
		几丁质酶和甜蛋白	抗真菌病害
		大麦核糖体失活蛋白	抗真菌病害
07-029-102	Oklahoma State	?	耐干旱
06-318-101	USDA ARS	麦谷蛋白	蛋白质含量
06-291-103	USDA ARS	麦谷蛋白	蛋白质含量
06-087-02	Biogemma	?	淀粉代谢
06-073-07	Montana State	ADPG 焦磷酸化酶	产量
06-073-09	Montana State	GUS	标记
06-073-08	Montana State	小麦籽粒硬度主效基因 Puroindoline	饲料品质
06-065-09	Montana State	Cinn. alc. 脱氢酶	木质素
06-046-04	Syngenta	?	镰刀霉病
06-062-05	University of Nebraska	核糖体失活蛋白	镰刀霉病
06-053-01	Kansas State	表达沉默	PR 蛋白、赤霉病
06-062-06	University of Nebraska	凋亡基因抑制子	镰刀霉病

表 20.2　美国最近大麦田间试验申请状况

编号	申请者	基因	性状
07-057-113	Montana State	?	软质胚乳
07-057-112	Montana State	?	软质胚乳
06-352-102	Washington State	?	蛋白质
06-111-102	Washington State	大麦醇溶蛋白	蛋白质
06-114-104	Washington State	木霉蛋白	木霉抗性
06-073-11	Montana State	小麦籽粒硬度主效基因 Puroindoline	饲料品质
05-340-01	Washington State	乳铁蛋白，溶解酵素	蛋白质
06-059-10	University of Minnesota	翻译起始因子 5A	茎锈病
06-054-11	University of Idaho	单端孢霉烯酰转移酶	镰刀霉病
		内切几丁质酶	
		内切几丁质酶	

续表

编号	申请者	基因	性状
		甜蛋白相关蛋白	
		单端孢霉烯外排泵	
06-040-02	USDA ARS	单端孢霉烯酰转移酶	镰刀霉病
		单端孢霉烯外排泵	
		内切几丁质酶	
06-039-01	USDA ARS	转座子 AC	标记
05-090-01	Washington State	乳铁蛋白，溶解酵素	蛋白质
05-073-07	University of Idaho	甜蛋白相关蛋白	镰刀霉病
		抗药蛋白	
		单端孢霉烯酰转移酶	
		内切几丁质酶	

3. 遗传转化方法

现在，小麦［5，6］和大麦［7］有相对成熟的转化体系，而燕麦［8］的转化技术还不太成熟。目前，小麦［10，11］和大麦［12，13］转基因研究的重点是，不断提高农杆菌介导法的转化效率［9］，以及不复杂的组培技术的应用。此外，一些较简单的整合模式［14~17］和改进的共转化［18］等方法也正在被不断地开发出来。可以预期，这些方法将与质体转化方法（美国专利：7186560）一起继续发展与完善（表 20.1）。

除了较为“经典”的核转化方法外，其他一些新技术，如激光微束刺穿法［19］和电穿孔法［20］也已被开发出来。

4. 农艺性状

由于涉及商业机密，在近期开展的田间试验中，所测定的许多性状（表 20.1 和表 20.2），包括农艺性状，其全部细节无法得知。以下的综述将采用已公开的一些资料。

4.1　耐除草剂

小麦耐除草剂的例子，最成功的或许是小麦抗草甘膦。这些小麦已在许多地点开展了相关的测试，最近的一项研究表明［21］，草甘膦控制杂草的效果往往比传统的除草剂更好；与常用的灌装混合除草剂相比，草甘膦防治小麦杂草可增产约 10%。这些普通小麦转基因品系，以及转同效基因的硬质小麦品系，已获得加拿大管理部门的批准：“……，自 2007 年 1 月 4 日起，（加拿大）植物产品理事会的植物生物安全办公室（Plant Biosafety Office，PBO）和动物健康与生产处饲养管理部门，授权自由地环境释

放 CLEARFIELD™硬粒小麦品系 DW2、DW6 和 DW12，并批准硬质小麦项目 DW12 可用作牲畜饲料。任何由 DW2、DW6 和 DW12 品系中衍生出的品系也可以环境释放，任何由 DW12 品系衍生出的品系可以用作牲畜饲料……”。同样，“自 2006 年 6 月 22 日起，普通小麦品系 BW255-2 和 BW238-3 也被批准环境释放和用作牲畜饲料”。尽管上述品系已通过审批，但能否完全商业化还不能确定。

4.2　耐虫性

最近与耐虫性相关的研究报道有：利用豇豆胰蛋白酶抑制剂防治麦蛾（*Sitotroga cerealella* Olivier）[22]，利用马铃薯蛋白酶抑制剂（PIN2）防治线虫[23]。

4.3　耐病性

4.3.1　真菌

最近，多数转基因小麦和大麦的田间试验涉及抗真菌研究（表 20.1 和表 20.2）。其中一个申请项目来自先正达公司，它们申请在加拿大马的尼托巴种植抗镰刀菌的材料（申请号 06-sbi1-295-wht01-0871-mb007-01）。其他已报道的研究还包括提高综合抗性[24]、抗网腥黑穗病（*Tilletia caries*）[25]、抗白粉病（*Blumeria graminis*）[26，27]、抗赤霉病（*Fusarium graminearum*）[28~31]、抗小麦叶锈病（*Puccinia triticina*）等试验[32]。有报道[33]，在转基因燕麦种子中表达大麦硫素蛋白（hordothionin），获得对镰刀菌的抗性。除了这些特异性基因的研究外，还有报道通过优化启动子，以调控基因在需要的植物器官中的表达（表 20.3 和表 20.4）。例如，大麦 *Lem2* 基因启动子，调控基因在禾谷类作物幼穗特定发育时期和特定组织细胞中表达，尤其是在外稃和外果皮中表达[34]。

表 20.3　最近获得授权的美国专利

日期	编号	项目	代理人
2007. 03. 06	7 186 892	景天庚糖二磷酸酶	孟山都
2007. 03. 06	7 186 890	丝氨酸 *O*-乙酰基转移酶	杜邦
2007. 03. 06	7 186 884	香树脂醇合成酶	Plant Biosci.
2007. 03. 06	7 186 563	转录因子	Purdue RF
2007. 03. 06	7 186 561	耐盐性	巴斯夫
2007. 03. 06	7 186 560	质体转化	Rutgers
2007. 02. 27	7 183 457	抗霉病性	杜邦
2007. 02. 27	7 183 398	耐盐性	Sapporo Brew
2007. 02. 27	7 183 109	胚特异性表达启动子	Appl. Bio. Inst
2007. 02. 20	7 179 964	增强型硫氧还蛋白	加利福尼亚大学
2007. 02. 20	7 179 963	CLAVATA 蛋白	先锋
2007. 02. 20	7 179 962	耐逆性	巴斯夫

表 20.4　最近申请的美国专利

日期	编号	项目	申请者
2007.03.01	20 070 060 869	胚液囊特异表达基因	Advanta1
2007.03.01	20 070 050 864	核酮糖-1，5-二磷酸羧化酶活化酶	先锋
2007.02.22	20 070 044 180	玉米矮化基因 Brachytic2 启动子	先锋
2007.02.22	20 070 044 176	硝酸盐运输	杜邦
2007.02.22	20 070 044 172	氮高效	?
2007.02.22	20 070 044 171	植物改良	孟山都
2007.02.22	20 070 044 169	雄性/雌性不育	先正达
2007.02.15	20 070 039 074	基因靶向技术	Carolina
2007.02.08	20 070 033 677	双向启动子	台湾大学
2007.02.08	20 070 033 673	膜联蛋白启动子	杜邦
2007.02.08	20 070 033 670	抗除草剂小麦	巴斯夫
2007.02.01	20 070 028 327	胚乳特异表达启动子	Biogemma
2007.02.01	20 070 028 320	人工植物染色体	芝加哥大学

4.3.2　病毒

最近，报道了两例关于转基因小麦获得抗大麦黄矮病毒（BYDV）的研究，一例是表达由大麦黄矮病毒病（BYDV）GPV 菌株的双链复制酶（dsRNA）为茎、外壳蛋白基因同源反义 RNA 为环构建的复合发夹 RNA（hpRNA）结构［35］，另一例是表达裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）的 *pac*1 基因［36］。

4.3.3　耐非生物逆境

与抗病相比，耐非生物逆境研究的报道较少。已报道的有甘露醇积累转基因小麦耐盐和水胁迫［37］，以及转大麦 *HVA1* 基因使燕麦具有耐盐性［38］。最近，来自抗冻多肽的抗冻蛋白 HPLC-6，经重新合理构建后转入小麦中，转基因小麦表现出极强的抗冻能力，即使低至-7℃时，也表现出显著的防冻保护能力［37］。不久前，一项来自澳大利亚的小麦田间试验申请特别令人关注（目录 071/2006）（http://www.ogtr.gov.au/rtf/ir/dir071appsum.rtf），“每个转基因小麦株系均携有 6 个可提高耐旱性的基因编码蛋白中的 1 个。这些基因有来自植物的拟南芥和玉米、来自苔藓的小立碗藓（*Physcomitrella patens*）和来自酵母的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）。每个基因都构建了两种表达框，一种由胁迫诱导启动子启动，另一种由组成型启动子启动，由此构建的 12 个不同的基因结构，转化获得了 30 个转基因小麦株系”。还有报道称，通过异位表达小 RAC/ROP 家族的 G 蛋白，转基因大麦株系获得了生物和非生物逆境的抗性［40］。也有报道，在大麦中超表达 1，3-脂肪氧化酶基因，可修饰羟脂代谢信号通路，从而延缓植株的衰老［41］。

5. 品质性状

5.1 蛋白质和淀粉

目前，有许多报道通过转基因改良谷物种子蛋白质成分的研究。例如，通过基因操作可以改变小麦中高分子质量（HMW）的谷蛋白亚基的组成，而并不影响小麦农艺性状［42］。最近研究发现，高水平表达高分子质量亚基 1Dx5 和/或 1Dy10 的转基因小麦，其面团具有较高的搅拌强度和韧性［43］。一项相关研究表明，两份分别含有约 20 个和 50 个 HMW 谷蛋白单基因拷贝及其启动子的转基因小麦株系中，检测到了相关的染色质解凝过程［44］。在反义抑制硫氧还蛋白积累的转基因株系中，已检测到谷蛋白的降解［45］。另一种改良蛋白品质的方法，是通过野生型 *Pina* 基因序列互补其无效等位基因，使转基因小麦恢复了软质表型［46］。

有关改良淀粉品质的报道并不多。一个报道是 RNA 沉默 *Waxy* 基因，使转基因小麦籽粒直链淀粉含量降低［47］。在一项更深入的研究中，转改良的玉米 ADP-葡萄糖腺苷二磷酸焦磷酸化酶大亚基（sh2r6hs）基因的小麦，进行了田间试验测试。采用不同种植密度和灌溉方式，在 3 个点进行了超过 4 年的转基因田间测试，结果表明，稀植、灌溉环境比密植、旱作环境条件下更有可能显著提高产量。由此认为，有限的非生物资源的反而会限制由 *Sh2r6hs* 相关基因的增产效果［48］。

其他一些研究进展是关于在转基因禾谷类作物中酶的产生的质量或数量（见 5.2 节）。例如，在转基因小麦中生产热稳定的植酸酶［49］；通过增强 HvGAMYB 转录因子的表达，转基因大麦提高糊粉粒细胞水解酶的产量，从而改进麦芽品质［50］。

正如其他转基因研究一样，这些研究的成功取决于合适的启动子的利用；近期一项研究研发出一种新的顺式作用元件 ESP，它在燕麦球蛋白启动子中可促进目的基因在胚乳中特异性的高水平表达［51］。

5.2 生物燃料

当前，随着对减缓全球温室效应的日益重视，世界各国关注如何提高植物能源比例，从而减少非化石燃料。

背景

生物燃料指由淀粉或碳水化合物的聚合物（特别是纤维素）获得的生物乙醇或其他醇类，或由油脂类物质生产的生物柴油。目前，在巴西等一些国家，生物燃料已经成为主要的燃料，在其他许多国家，低浓度的生物燃料用作添加剂。当前国际上的相关动态，包括联合国最新公布的合作项目，可从国际农业生物技术应用服务组织（ISAAA）的生物燃料附录（http//www. isaaa. org/kc/ cropbiotechupdate/biofuels/news/ 2007/03/09）和生物燃料评述（http://www. biofuelreview. com/content/view/799/2/）等网页中获取。据估计，目前全球玉米产值约有 220 亿美元，由于美国和其他一些国家对玉米的基因改良品种及生物乙醇需求的扩大，预计至 2020 年其产值可达 350 亿美元［52］。在

欧洲，2003 年颁布了生物燃料条例，目的在于促进运输行业使用生物燃料和其他可再生燃料，这也为各成员国提出了指导性目标。为了达到 2010 年生物燃料占运输业燃料市场总份额 5.75% 的目标，欧洲委员会采纳了欧盟生物燃料的战略（http://ec.europa.eu/energy/res/biomass_action_plan/doc/2006_02_08_comm_eu_strategy_en.pdf），EPOBIO 联合组织概括了进一步的研究工作（http://www.epobio.net/）。有关英国产业定位的总结见网页 http://www.bcsbioscience.co.uk/bcs/biocms/biocms.nsf/id/bunb-68bgu4?OpenDocument.。

先正达公司推出的玉米品系 3272，可能是专用于生产生物乙醇的最优良转基因品系。该品系经改良后含有玉米淀粉酶，这为生产乙醇的生物工艺过程改进了玉米淀粉转化为糖的发酵能力。该产品正在进行优良品系培育、田间试验和监管机构的备案，计划在 2008 年前进入生产。据先正达公司估计，美国种植生产乙醇专用玉米的比例，将从 2003 年和 2004 年的约 10%，增加到 2008 年的 30%，以后甚至更高，而乙醇的产量从不足 50 亿加仑/年，到 2011 年的将接近 150 亿加仑/年。新型生物乙醇或转基因生物乙醇的核心科技，是利用更高效的酶将淀粉或纤维素等生物质转化为可发酵的糖类。正如目前许多在生物技术和食品生产中使用的其他酶一样，可以预计这类酶有许多将需要经过基因重组，或者说需要转基因改良。许多公司正大量地投资于该项技术的研发。有关这一领域的经济趋势分析（http://www.purchasing.com/index.asp?layout=articlePrint&articleID=CA6419082）指出"杰能科公司正致力于生物酶商业开发，以适用于未来纤维素生物燃料生产的需要。其他大公司，包括先正达公司、Diversa 公司、杜邦公司、诺维信（Novozymes）公司和 Codexis 公司等也正在开展类似的项目研发"。

除了玉米 3272 品系外，先正达公司还希望研制一种所需的酶，以在绿色植物中生产纤维素生物燃料。它声称，与传统的生产方法如发酵工艺相比，这种植物表达的酶可为生物燃料生产"提供最低成本的酶制剂"。Diversa 公司在生物燃料项目上与先正达公司合作，正在从各种资源中寻找编码纤维素降解酶的基因，包括从天然消化纤维素的牛胃中。2007 年 1 月 8 日，最新公布的商业投资报告（http://www.seedquest.com/news/releases/2007/january/18020.htm）中，提到了先正达公司和 Diversa 公司特别联合投资的项目。这个新协议允许 Diversa 公司利用其专有的平台独立开发和商业化生产基于发酵技术的酶制品，而先正达公司将独家享有在植物中表达这些酶的使用权，以便提高生产经济效益。很可能这项技术的许多内容适用于任何生物质，无论是来自玉米还是其他禾谷类作物。最近，美国农业部的一份报告总结了有关身份认证（identity preservation）的问题，特别是有关美国玉米，包括生物燃料玉米的 IP 问题［53］。

毫不意外，反对利用转基因植物作为原料生产生物燃料，或所谓的怪物燃料的声音多来自一些媒体（http://www.newstatesman.com/200608070031），以及其他一些运动组织（http://www.i-sis.org.uk/nbr.php）。

除了蓄意的政治反对外，也存在某些基于经济原因误导的反对意见［54，55］。概括这些观点认为，生产玉米生物质燃料所消耗的燃料，比其产生的燃料还要多 29%，如生产大豆生物柴油需要多消耗 27% 的燃料；柳枝稷要多用 45%；木质生物质要多用

57%；向日葵要多消耗 118%。大众所关注的问题是，美国 18% 的玉米已用于生产汽车所消耗的乙醇，而不是用作粮食，将来消耗掉的可能更多。在欧洲，面临着同样的问题，那就是小麦抑或是大麦将被用作生物燃料的原料。

5.3 生物制药

虽然利用植物获得活性蛋白至今没有获得商业上的成功［57］，但是过去十年间，相对于利用微生物获取活性蛋白，其受到了更多的关注［56］。Ventria 公司是开发植物活性蛋白的企业之一，其生产平台是基于在水稻和大麦种子中表达外源基因。在美国，用于生产乳铁蛋白和其他化合物的转基因作物已经开展了田间试验。最近相关的研究报道，包括在大麦胚乳中表达的糖基化 F4（K88）菌毛黏附素 FaeG［58］。这种蛋白质通过口服使仔猪对 F4-阳性肠毒素性大肠杆菌（enterotoxigenic *Escherichia coli*，ETEC），一种常见的引发猪断奶后腹泻的细菌，可以获得免疫。另一个案例是，用于滴眼液的单链抗体片段，已在一种小麦商业品种中高水平地表达［59］。

6. 小结

目前，转基因小麦和大麦在传统农业体系及高附加值行业中都有了丰富的生产经验。这一毋庸置疑的潜力［60］能否成功实现，更多地取决于政府的监管和公众的接受程度，而不是科学自身潜在的不确定性。

（王美兴　王建军　译）

参考文献

1. Dunwell，J. M.（2002）Future prospects for transgenic crops. *Phytochem. Rev.* **1**，1-12.
2. *Dunwell，J. M.*（2005）*Transgenic Crops：Current and Future Generations. Methods in Molecular Biology，Vol.* 286，*in* Transgenic Plants：Methods and Protocols（*Pe? a，L，ed.*），*Humana*，*Totowa*，*NJ*，*pp.* 377-397.
3. *Dunwell，J. M.*（2005）*Review：Intellectual property aspects of plant transformation.* Plant Biotech. J. **3**，371-384.
4. Dunwell，J. M.（2006）Patents and transgenic plants. *Acta Hortic.* **725**，719-732.
5. *Vasil，I. K. and Vasil，V.*（2006）*Transformation of wheat via particle bombardment.* Methods Mol. Biol. **318**，273-283.
6. Wan，Y. and Layton，J.（2006）Wheat（*Triticum aestivum* L.）. *Methods Mol. Biol.* **343**，245-53.
7. *Jacobsen，J.，Venables，I.，Wang，M. B.，Mat-thews，P.，Ayliffe，M. and Gubler，F.*（2006）*Barley*（Hordeum vulgare *L.*）. Methods Mol. Biol. **343**，171-183.
8. Perret，S. J.，Valentine，J.，Leggett，J. M. and Morris，P.（2003）Integration，expression and inheritance of transgenes in hexaploid oat（*Avena sativa* L.）. *Plant Physiol.* **160**，931-943.
9. *Shrawat，A. K. and L? rz，H.*（2006）Agrobacterium-*mediated transformation of cereals：a promising approach crossing barriers.* Plant Biotechnol. J. **4**，575-603.

10. Patnaik, D, Vishnudasan, D. and Khurana, P. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Sci.* **91**, 307-317.

11. *Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., Nozue, M. and Kojima, M.* (2006) *Development of simple and efficient* in planta *transformation method for wheat* (Triticum aestivum *L.*) *using* Agrobacterium tumefaciens. J. Biosci. Bioeng. **102**, 162-170.

12. Holme, I. B., Brinch-Pedersen, H., Lange, M. and Holm, P. B. (2006) Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of *in vitro* cultured ovules. *Plant Cell Rep.* **25**, 1325-1335.

13. Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. and Lrz H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* **4**, 251-261.

14. Shrawat, A. K., Becker, D. and Lrz, H. (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Sci.* **172**, 281-290.

15. Lange, M., Vincze, E., Moller, M. G. and Holm, P. B. (2006) Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* **25**, 815-820.

16. *Wu, H. X., Sparks, C. A. and Jones, H. D.* (2006) *Characterisation of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by* Agrobacterium*mediated transformation.* Mol. Breed. **18**, 195-208.

17. Yao, Q., Cong, L., Chang, J. L., Li, K. X., Yang, G. X. and He, G. Y. (2006) Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* **57**, 3737-3746.

18. *Yao, Q., Cong, L., He, G., Chang, J., Li, K. and Yang, G.* (2007) *Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency.* Mol. Biol. Rep. **34**, 61-67.

19. Badr, Y. A., Kereim, M. A., Yehia, M. A., Fouad, O. O. and Bahieldin, A. (2005) Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 803-807.

20. *Liang, H., Wu, F. S., Wang, D. W., Sun, D. F. and Jia, X.* (2005) *Wheat transformation by electroporation with ring electrode.* Yi Chuan Xue Bao **32**, 66-71.

21. Howatt, K. A., Endres, G. J., Hendrickson, P. E., Aberle, E. Z., Lukach, J. R., Jenks, B. M., Riveland, N. R., Valenti, S. A. and Rystedt, C. M. (2006) Evaluation of glyphosate-resistant hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). *Weed Technol.* **20**, 706-716.

22. *Bi, R. M., Jia, H. Y., Feng, D. S. and Wang, H. G.* (2006) *Production and analysis of transgenic wheat* (Triticum aestivum *L.*) *with improved insect resistance by the introduction of cowpea trypsin inhibitor gene.* Euphytica **151**, 351-360.

23. Vishnudasan, D., Tripathi, M. N., Rao, U. and Khurana, P. (2005) Assessment of nematode resistance in wheat transgenic plants expressing potato proteinase inhibitor (*PIN2*) gene. *Transgen. Res.* **14**, 665-675.

24. *Tobias, D. J., Manoharan, M., Pritsch, C. and Dahleen, L. S.* (2006) *Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley* (Hordeum vulgare *cv. Conlon*). Plant Cell Rep., *in press.*

25. *Schlaich, T., Urbaniak, B. M., Malgras, N., Ehler, E., Birrer, C., Meier, L. and Sautter, C.* (2006) *Increased field resistance to* Tilletia caries *provided by a specific antifungal virus gene in genetically engineered wheat.* Plant Biotechnol. J. **4**, 63-75.

26. *Subhankar, R. B., Sautter, C. and Chattoo, B. B.* (2006) *Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP*1 *in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses.* Transgen. Res. **15**, 435-446.
27. Zhao, T. J., Zhao, S. Y., Chen, H. M., Zhao, Q. Z., Hu, Z. M., Hou, B. K. and Xia, G. M. (2006) Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Rep.* **25**, 1199-1204.
28. *Balconi, C., Lanzanova, C., Conti, E., Triulzi, T., Forlani, F., Cattaneo, M. and Lupotto, E.* (2007) *Fusarium head blight evaluation in wheat transgenic plants expressing the maize b-*32 *antifungal gene.* Eur. J. Plant Pathol. **117**, 129-140.
29. Mackintosh, C. A., Garvin, D. F., Radmer, L. E., Heinen, S. J. and Muehlbauer, G. J. (2006) A model wheat cultivar for transformation to improve resistance to Fusarium head blight. *Plant Cell Rep.* **25**, 313-319.
30. *Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick, H. N. and Shah J.* (2006) *Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR*1. Mol. Plant Microbe Interact. **19**, 123-129.
31. *Manoharan, M., Dahleen, L. S., Hohn, T. M., Neate, S. M., Yu, X. H., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Bregitzer, P., Schwarz, P. B. and Horsley, R. D.* (2006) *Expression of* 3-*OH trichothecene acetyltransferase in barley* (Hordeum vulgare *L.*) *and effects on deoxynivalenol.* Plant Sci. **171**, 699-706.
32. Luo, L., Zhang, J., Yang, G., Li, Y., Li, K. and He G. (2007) Expression of puroindoline a enhances leaf rust resistance in transgenic tetraploid wheat. *Mol. Biol. Rep.*, in press.
33. Carlson, A., Skadsen, R. and Kaeppler, H. F. (2006) Barley hordothionin accumulates in transgenic oat seeds and purified protein retains anti-fungal properties *in vitro. In Vitro Cell. Develop. Biol. -Plant* **42**, 318-323.
34. *Abebe, T., Skadsen, R., Patel, M. and Kaeppler, H.* (2006) *The* Lem2 *gene promoter of barley directs cell-and development-specific expression of gfp in transgenic plants.* Plant Biotechnol. J. **4**, 35-44.
35. Yan, F., Zhang, W. W., Xiao, H., Li, S. F. and Cheng, Z. M. (2007) Transgenic wheat expressing virus-derived hairpin RNA is resistant to barley yellow dwarf virus. *Yi Chuan* **29**, 97-102.
36. *Yan, F., Zheng, Y. Y., Zhang, W. W., Xiao, H., Li, S. F. and Cheng, Z. M.* (2006) *Obtained transgenic wheat expressing pac*1 *mediated by* Agrobacterium *is resistant against barley yellow dwarf virus-GPV.* Chinese Sci. Bull. **51**, 2362-2368.
37. Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B. and Cushman, J. C. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* **131**, 1748- 1755.
38. *Oraby, H. F., Ransom, C. B., Kravchenko, N. and Sticklen, M. B.* (2005) *Barley HVA*1 *gene confers salt tolerance in R*3 *transgenic oat.* Crop Sci. **45**, 2218-2227.
39. Khanna, H. K. and Daggard, G. E. (2006) Targeted expression of redesigned and codon optimised synthetic gene leads to recrystallisation inhibition and reduced electrolyte leakage in spring wheat at subzero temperatures. *Plant Cell Rep.* **25**, 1336-1346.
40. *Schultheiss, H., Hensel, G., Imani, J., Broeders, S., Sonnewald, U., Kogel, K. H., Kumlehn, J. and Huckelhoven, R.* (2005) *Ectopic expression of constitutively activated RACB in barley enhances susceptibility to powdery mildew and abiotic stress.* Plant Physiol. **139**, 353-362.
41. Sharma, V. K., Monostori, T., Gobel, C., Hansch, R., Bittner, F., Wasternack, C., Feussner, I., Mendel, R. R., Hause, B. and Schulze. J. (2006) Transgenic barley plants overexpressing a 13-lipoxygenase to modify oxylipin signature. *Phytochem.* **67**, 264-276.

42. *Bregitzer, P., Blechl, A. E., Fiedler, D., Lin, J., Sebesta, P., De Soto, J. F., Chicaiza, and Dubcovsky, J.* (2006) *Changes in high molecular weight glutenin subunit composition can be genetically engineered without affecting wheat agronomic performance.* Crop Sci. **46**, 1553-1563.

43. Blechl, A., Lin, J., Nguyen, S., Chan, R., Anderson, O. D. and Dupont, F. M. (2007) Transgenic wheats with elevated levels of Dx5 and/or Dy10 high-molecularweight glutenin subunits yield doughs with increased mixing strength and tolerance. *J. Cereal Sci.* **45**, 172-183.

44. *Wegel, E., Vallejos, R. H, Christou, P., Stoger, E. and Shaw, P.* (2005) *Large-scale chromatin decondensation induced in a developmentally activated transgene locus.* J. Cell Sci. **118**, 1021-1031.

45. Guo, H. X., Yin, J., Ren, J. P., Wang, Z. Y. and Chen, H. L. (2007) Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* **33**, 18-24.

46. *Martin, J. M., Meyer, F. D., Smidansky, E. D., Wanjugi, H., Blechl, A. E. and Giroux, M. J.* (2006) *Complementation of the* pina (*null*) *allele with the wild type* Pina *sequence restores a soft phenotype in transgenic wheat.* Theor. Appl. Genet. **113**, 1563- 1570.

47. Li, J. R., Zhao, W., Li, Q. Z., Ye, X. G., An, B. Y., Li, X. and Zhang, X. S. (2005) RNA silencing of *Waxy* gene results in low levels of amylose in the seeds of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Yi Chuan Xue Bao* **32**, 846-854.

48. *Meyer, F. D., Talbert, L. E., Martin, J. M., Lanning, S. P., Greene, T. W. and Giroux, M. J.* (2007) *Field evaluation of transgenic wheat expressing a modified ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit.* Crop Sci. **47**, 336-342.

49. Brinch-Pedersen, H., Hatzack, F., Stoger, E., Arcalis, E., Pontopidan, K. and Holm, P. B. (2006) Heat-stable phytases in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.): deposition pattern, thermostability, and phytate hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4624-4632.

50. *Murray, F., Matthews, P., Jacobsen, J. and Gubler, F.* (2006) *Increased expression of HvGAMYB in transgenic barley increases hydrolytic enzyme production by aleurone cells in response to gibberellin.* J. Cereal Sci. **44**, 317-322.

51. Vickers, C. E., Xue, G. and Gresshoff, P. M. (2006) A novel cis-acting element, ESP, contributes to high-level endosperm-specific expression in an oat globulin promoter. *Plant Mol. Biol.* **62**, 195-214.

52. Yinbo, Q., Zhu, M., Liu, K., Bao, X. and Lin, J. (2006) Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China. *Biotechnol. J.* **1**, 1235-1240.

53. *Elbehri, A.* (2007) The Changing Face of the U. S. Grain System: Differentiation and Identity Preservation Trends. *USDA Economic Research Service. Economic Research Report No.* 35.

54. *Pimentel, D. and Patzek, T.* (2005) *Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower.* Earth Env. Sci. **14**, 65-76.

55. Pimentel, D., Patzek, T. and Cecil, G. (2007) Ethanol production: energy, economic, and environmental losses. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **189**, 25-41.

56. *Elbehri, A.* (2005). *Biopharming and the food system: Examining the potential benefits and risks.* AgBioForum **8**, 18-25.

57. Schunmann, P. H. D., Coia, G. and Waterhouse, P. M. (2002) Biopharming the SimpliRED (TM) HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Mol. Breed.* **9**, 113-121.

58. *Joensuu, J. J., Kotiaho, M., Teeri, T. H., Valmu, L., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M. and Niklander-Teeri, V.* (2006) *Glycosylated F4* (*K88*) *fimbrial adhesin FaeG expressed in barley endosperm in-*

duces ETEC-neutralizing antibodies in mice. Transgen. Res. **15**, 359-373.

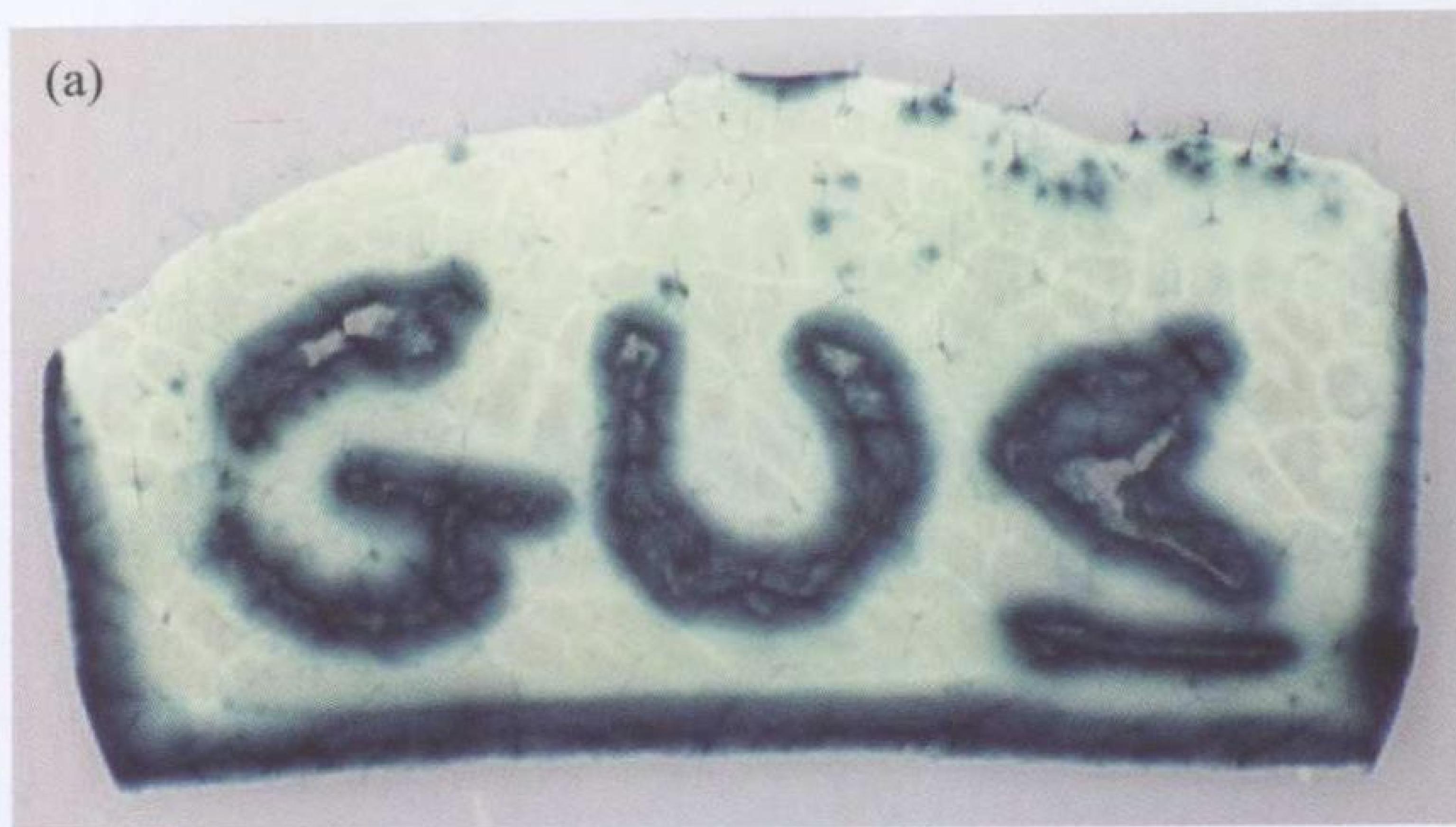
59. Brereton, H. M., Chamberlain, D., Yang, R., Tea, M., McNeil, S., Coster, D. J., and Williams, K. A. (2007) Single chain antibody fragments for ocular use produced at high levels in a commercial wheat variety. *J. Biotechnol*.

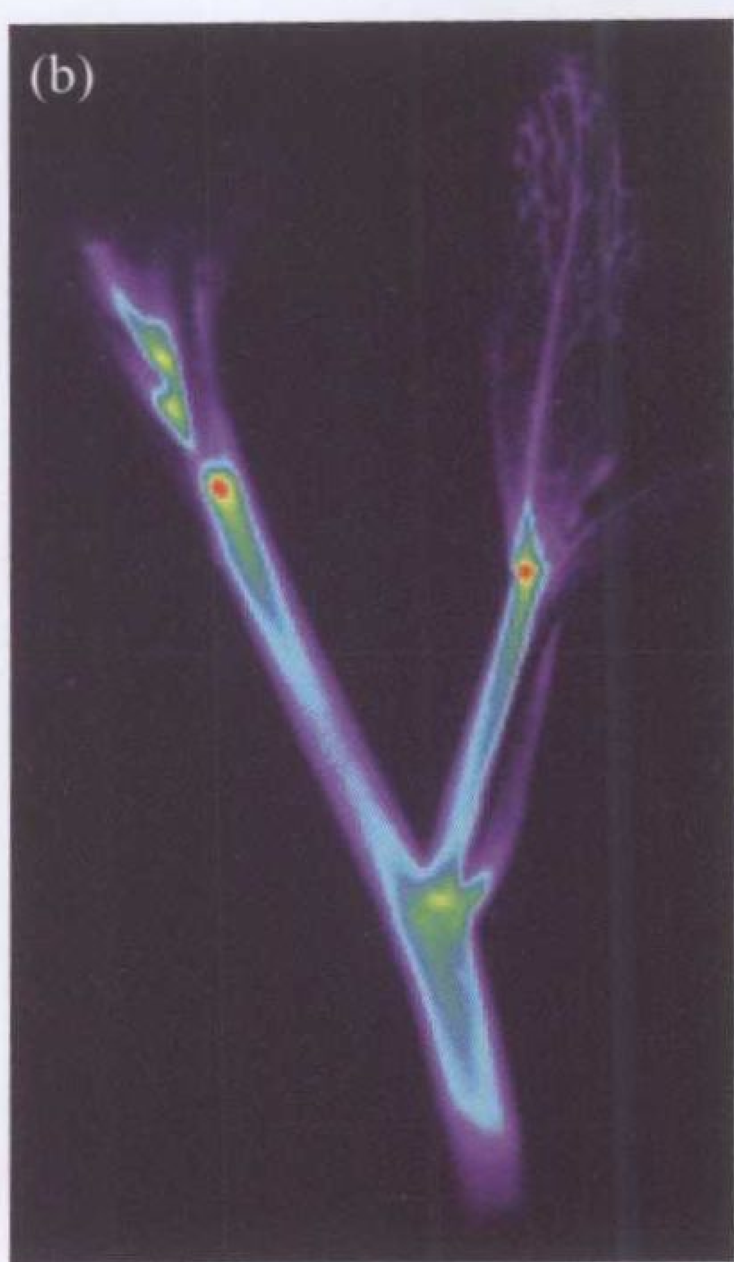
60. Bhalla, P. L. (2006) Genetic engineering of wheat-current challenges and opportunities. *Trends Biotechnol*. **24**, 305-311.

索　引

图　　版









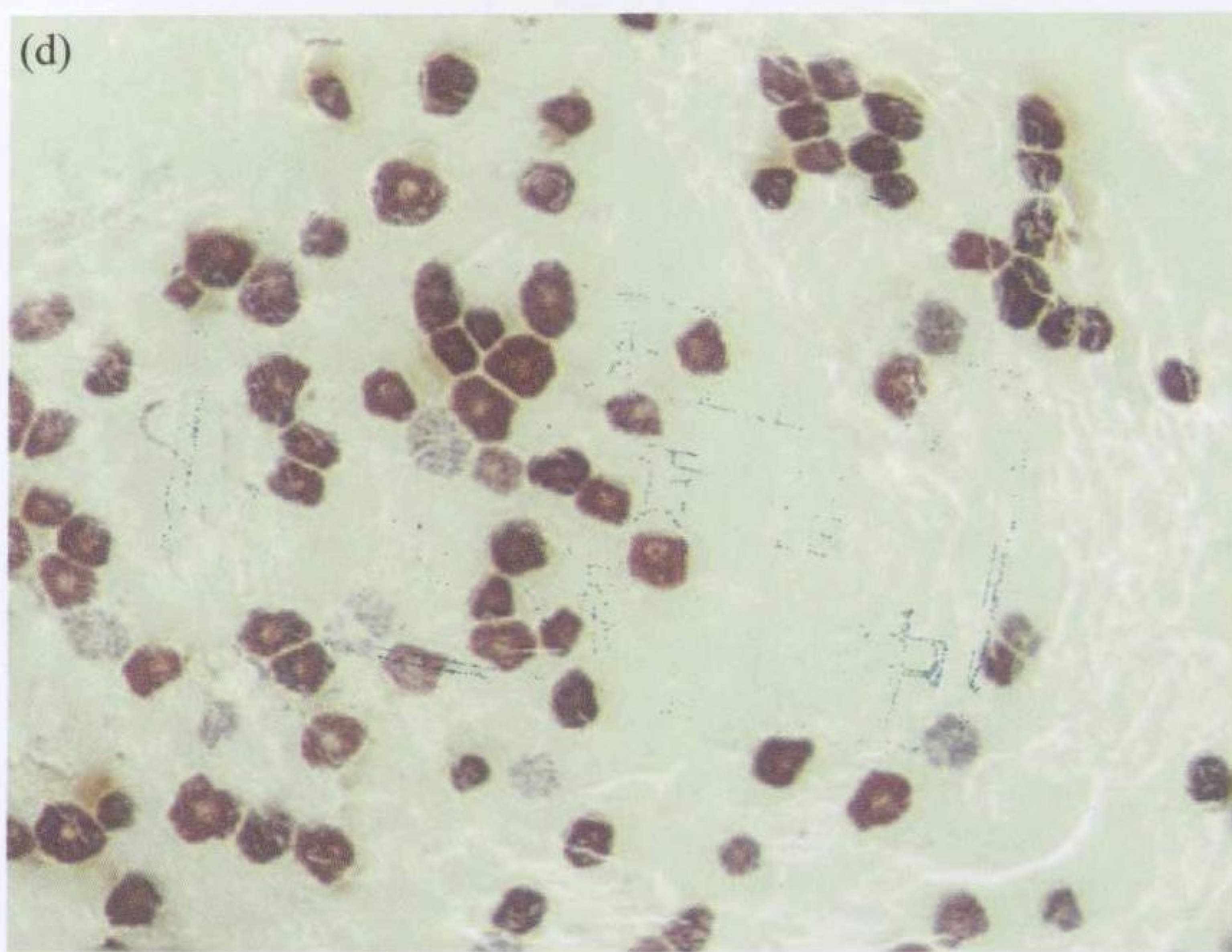


图3.1　(a) 拟南芥稳定转化植株叶片GUS活性的组织化学检测，其GUS活性由一个甘蓝型油菜高表达活性基因的启动子控制。(b) 同一启动子控制的*LUC*基因在拟南芥茎、茎生叶及正在发育花芽上部表达的活体检测。(c) 水稻actin启动子控制的sGFP S65T基因在小麦萌发的种子中的表达。(d) 花青素在发育的小麦糊粉细胞中的瞬时积累，基因枪轰击后,小麦8S球蛋白启动子驱动玉米*R-Lc*和*C1*基因的表达

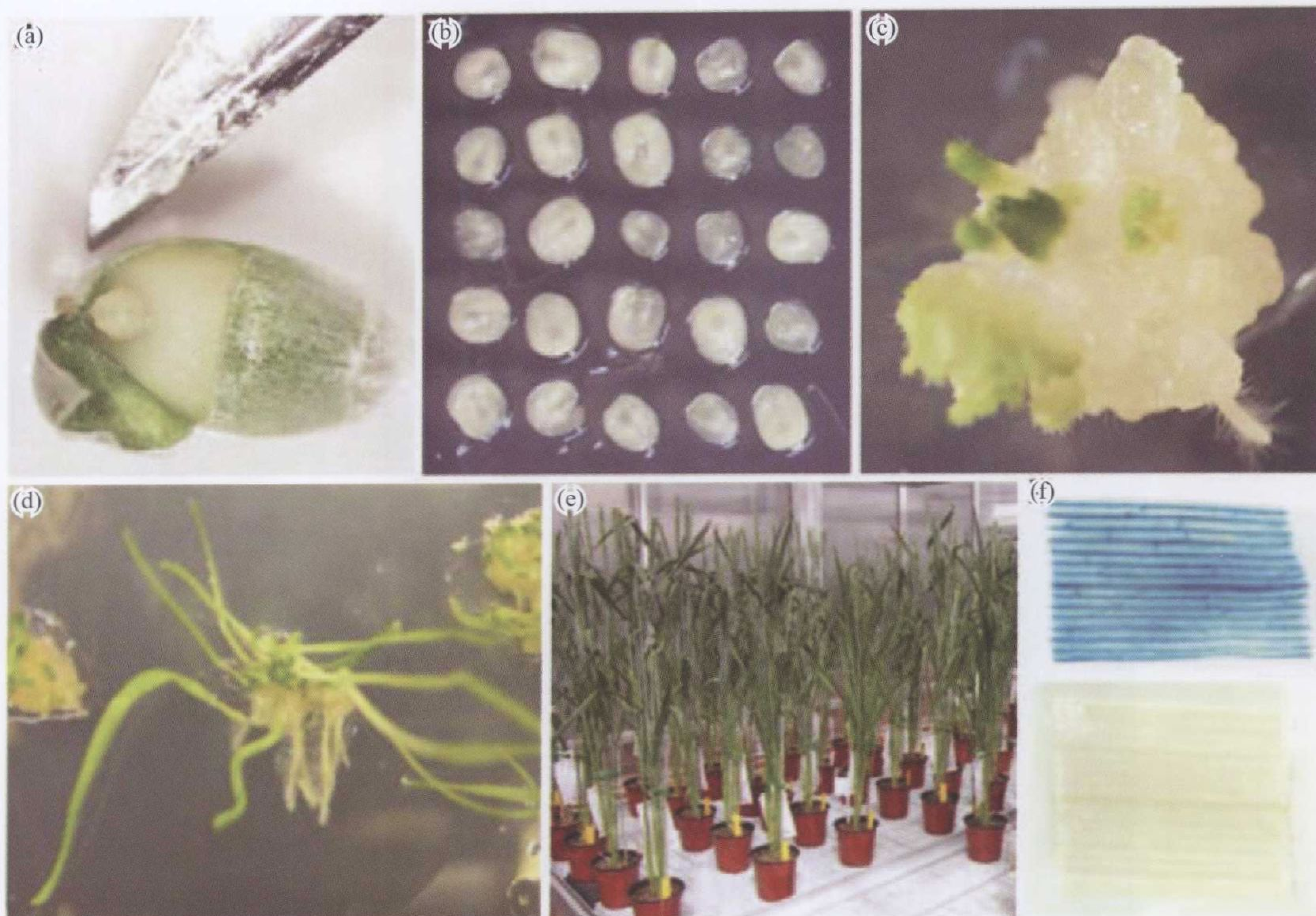


图4.1 （a）从小麦颖果中分离幼胚；（b）将盾片铺在平板上准备轰击；（c）形成愈伤组织（d）选择培养基上分化出小苗；（e） 分化出的转化植株生长在GM控制的温室；（f）叶片上β-葡萄糖苷酶基因的表达（上面）和对照（底部）



图6.2 转基因种子（左）和野生型（右）的对比。经携带有pBECKSred质粒（含有*Lc/C1*基因）农杆菌处理而获得的转基因种子与野生型相比，这些转基因阳性种子的胚/胚乳呈现深红色

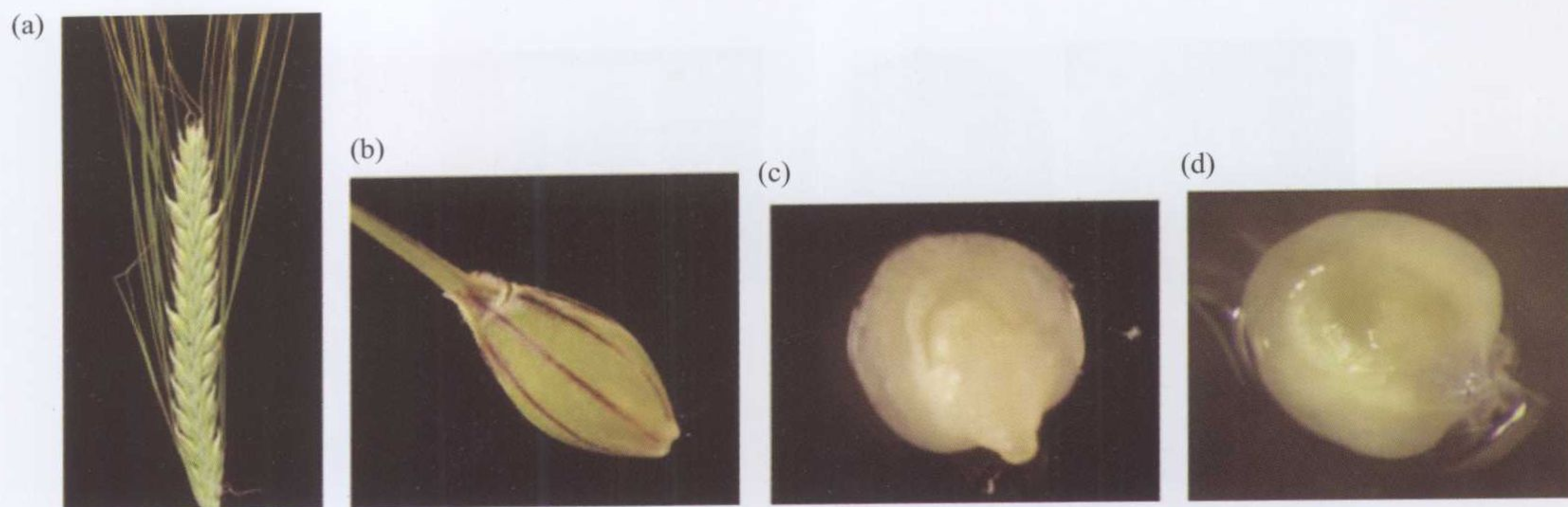


图9.2 选择大麦麦穗和幼胚的最佳时期。（a）含有幼胚的大麦麦穗。（b）含有幼胚的未成熟种子。（c）从未成熟种子中分离出完整的幼胚。（d）移除胚轴后的幼胚，用于农杆菌的接种

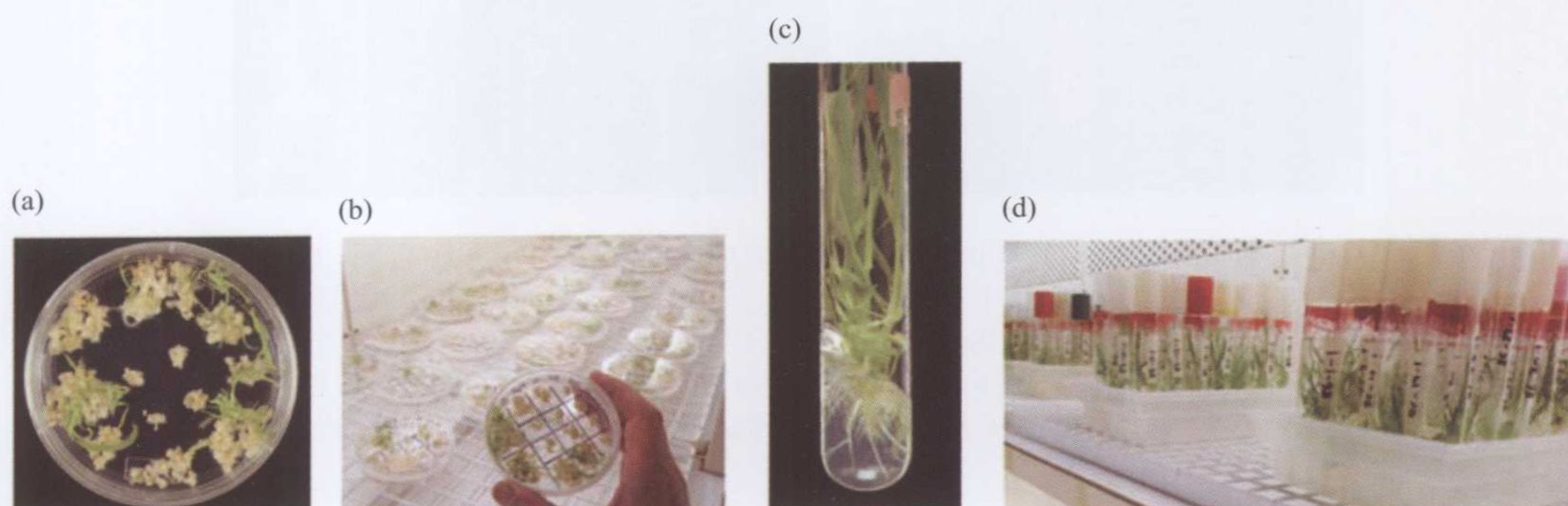


图9.3 用含潮霉素的培养基筛选转基因大麦。（a）再生培养基上，转化的愈伤排列在培养皿的边缘，未转化的愈伤在中间。（b）已转化大麦愈伤的继代培养。4个已转化愈伤的株系，对来自不同胚的愈伤进行标记。（c）转基因大麦植株在含潮霉素的生根培养基中根系生长良好。（d）温室中待移栽至土壤的转基因大麦幼苗。

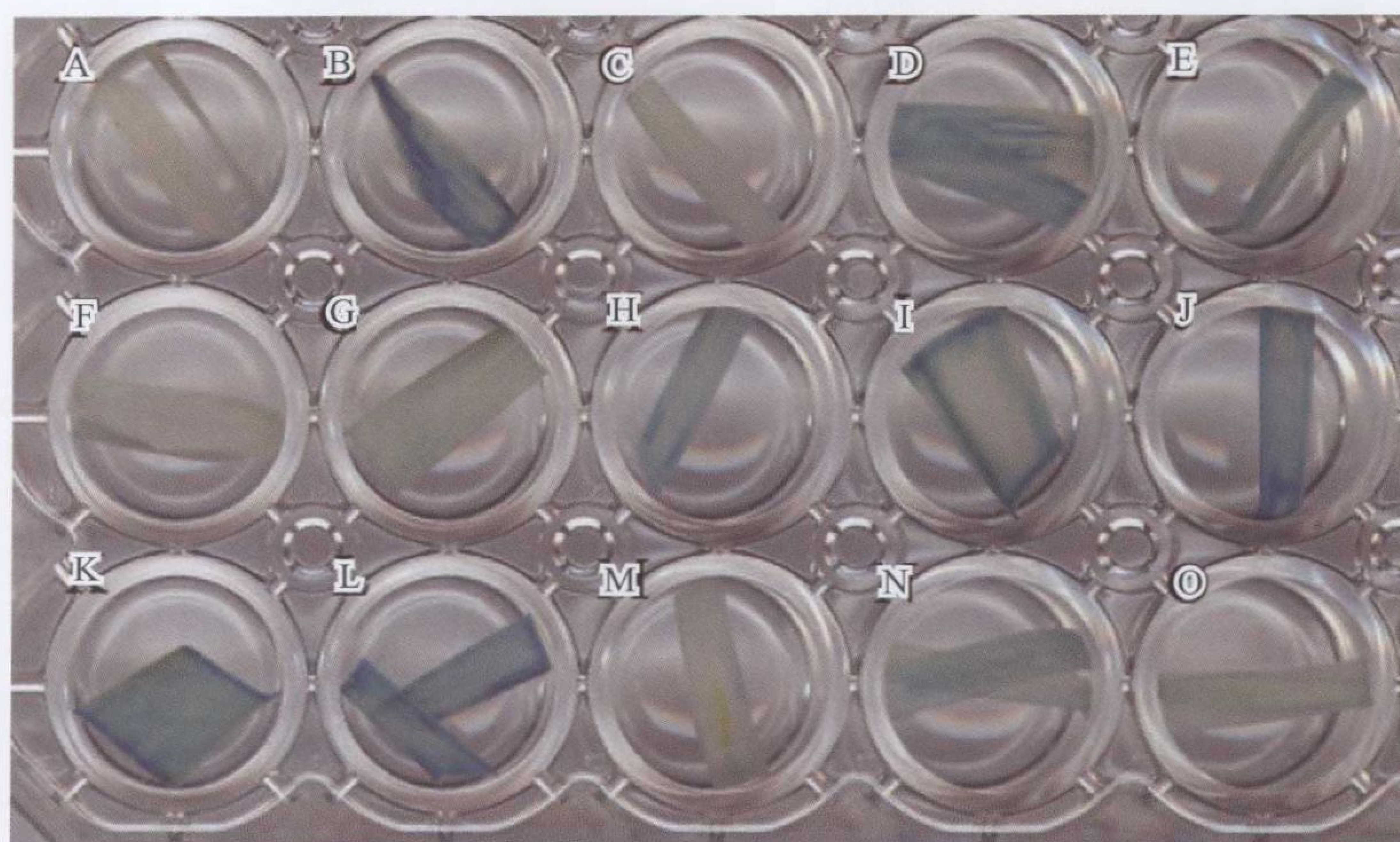


图9.4 转化pBract204载体后叶片GUS活性的组织化学染色结果。A和F孔中的样品无GUS染色，其他孔中的样品*gus*基因均有不同程度的表达

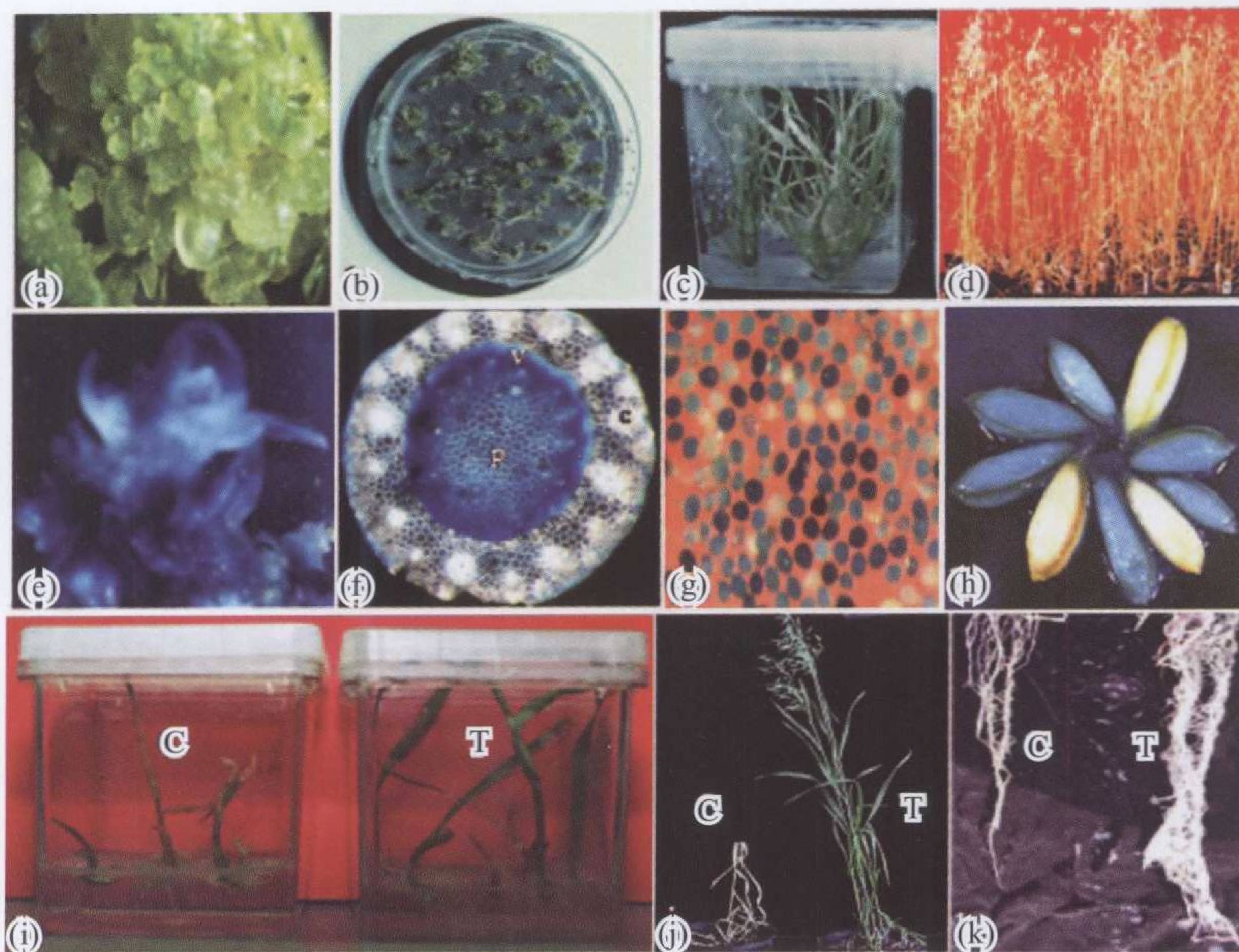


图10.2　燕麦（*Avena sativa* L.）转基因。（a）培养4周的芽尖分生组织；（b）基因枪轰击两周后未经筛选的增殖芽；（c）在选择培养基上再生的转基因苗；（d）温室中成熟的转基因燕麦；（e）丛生芽中GUS的表达；（f）茎横切片中GUS的表达模式；P，髓；V，维管束；C，皮层；（g）成熟花粉中的GUS表达；（h）种子中的GUS表达；（i）在盐胁迫（100 mmol/L）培养基中生长的燕麦幼苗；（j）用150 mmol/L盐溶液浇灌后的燕麦植株；（k）用100 mmol/L盐溶液浇灌后的燕麦的根；T，转基因；C，非转基因

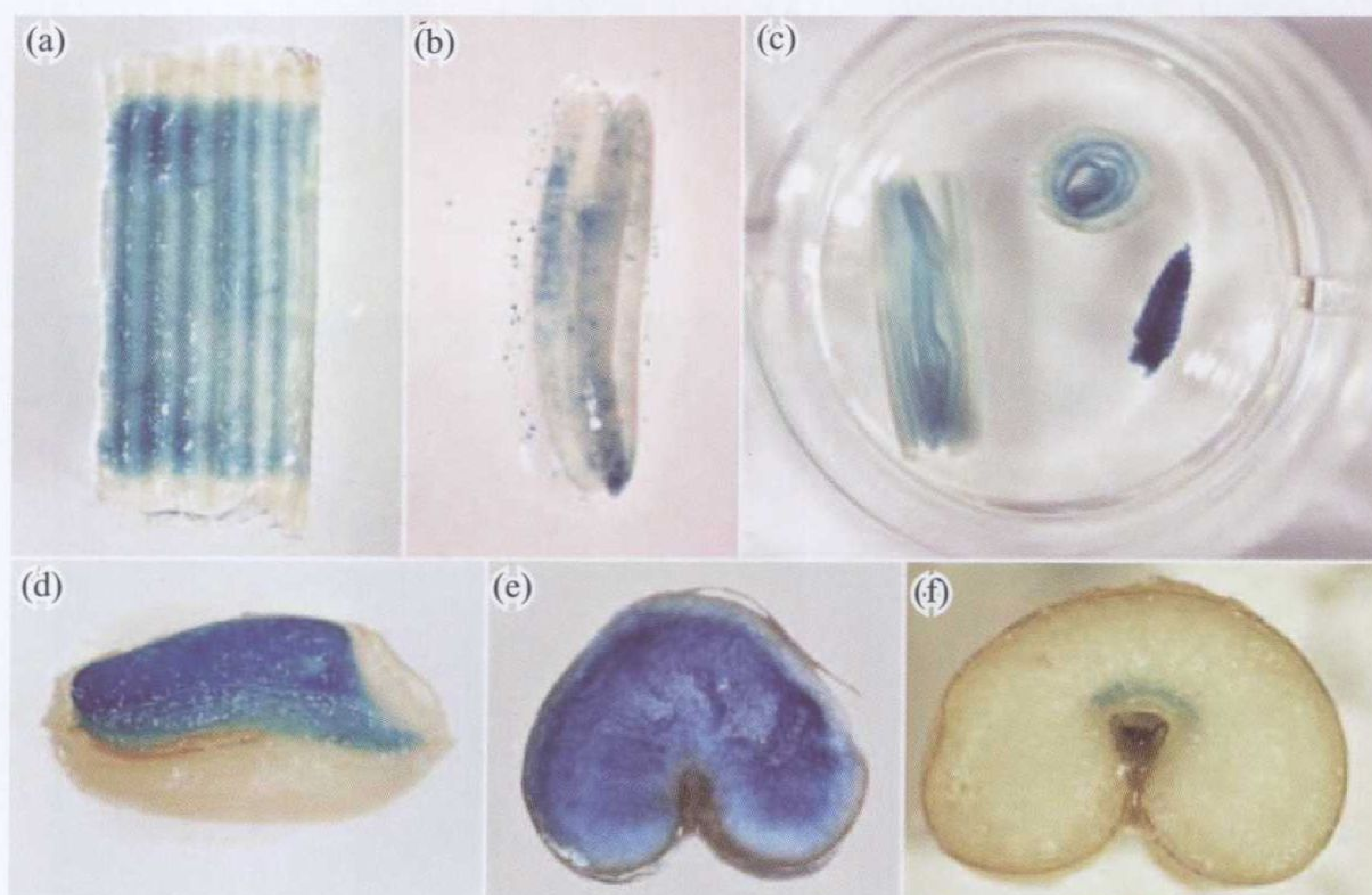


图11.1　不同启动子驱动GUS在稳定转化小麦不同组织中的表达情况：(a)玉米Ubiquitin1+内含子驱动GUS在Cadenza叶片中的表达；(b)玉米Ubiquitin1+内含子驱动GUS，Cadenza花药的花粉被染上了颜色；(c)水稻Actin1启动子驱动GUS在Cadenza的茎和幼嫩花序中的表达；(d)小麦高分子质量谷蛋白（HMW）Glu-1D-1启动子驱动GUS在Ofano半粒成熟种子中的表达表现出胚乳特异性；(e) Ofano半粒成熟种子示小麦嘌呤吲哚蛋白b(pinb)启动子在淀粉胚乳中的表达；(f) Cadenza半粒种子示玉米Glb1启动子在糊粉层传递细胞中的表达

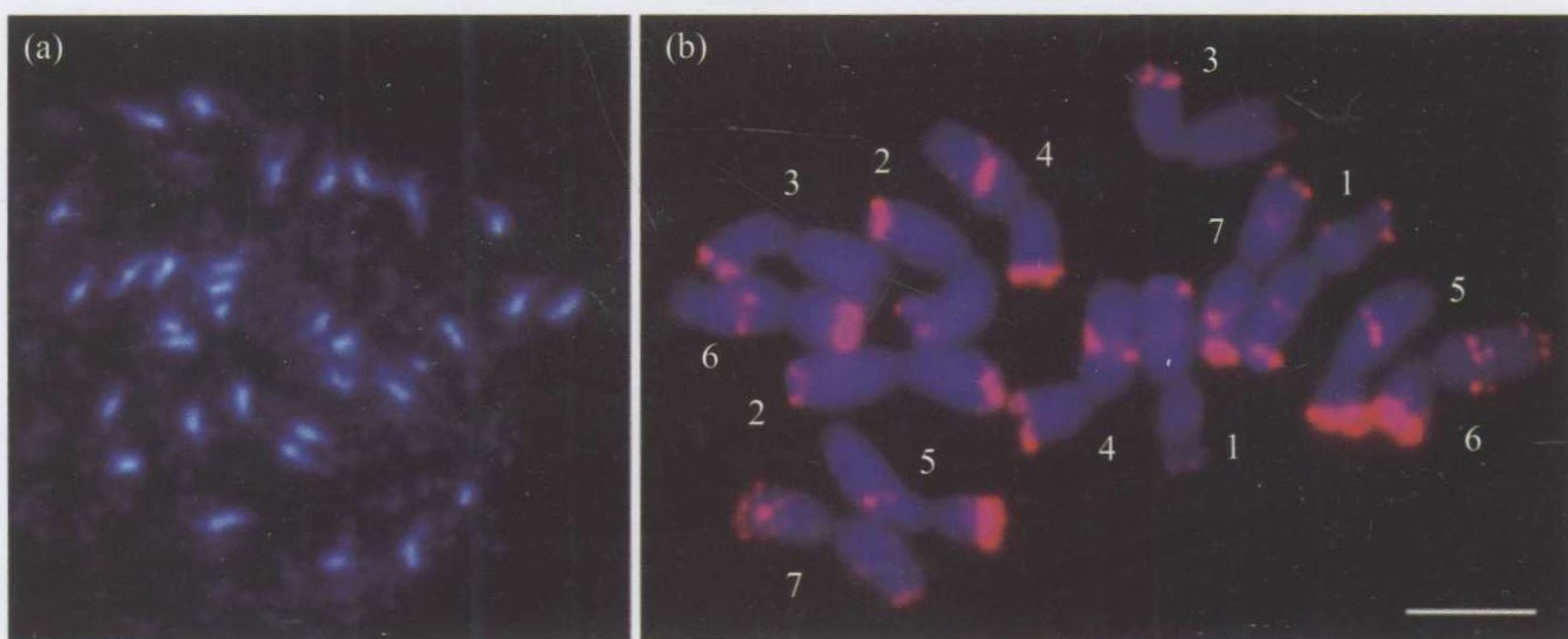


图14.1　染色体的荧光分析。（a）荧光染色体显带：三倍杂合体鲜食香蕉根尖有丝分裂中期33条染色体的DAPI染色 （UV激发）。所有染色体中着丝粒的异染色质区域荧光较强。染色体间的一些细胞质呈微弱荧光信号（b）以高度重复DNA家族为探针（生物素d-UTP标记探针，使用偶联链霉亲和素的Alexa594检测，红色荧光）与黑麦有丝分裂中期染色体杂交的FISH示例。染色体特异性的分布方式细节性地表现出了7对染色体上探针。标尺＝ 7μm

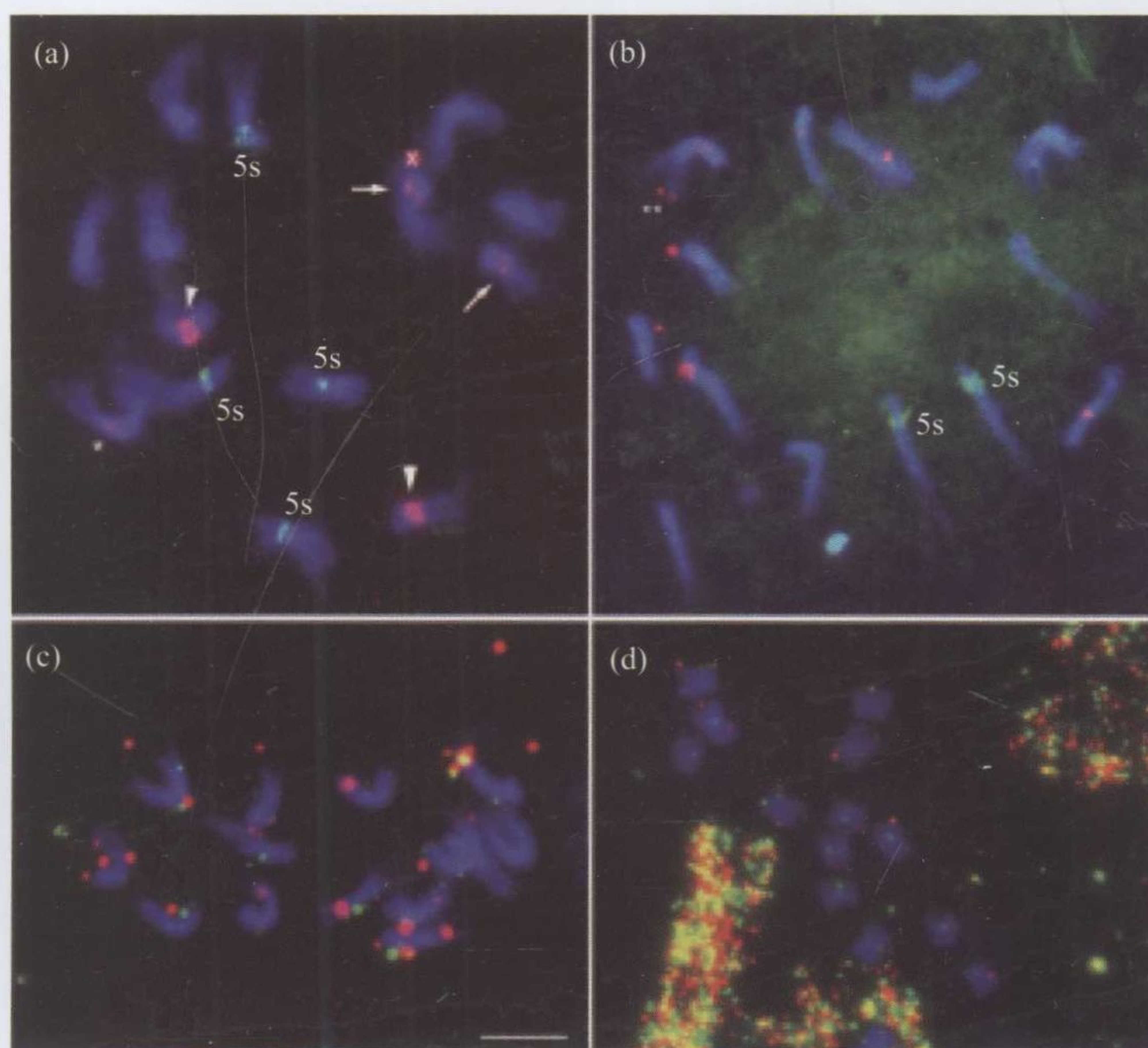


图14.3　FISH分析以及常见背景问题。使用内源性拟逆转录病毒EPRV作探针对野生矮牵牛有丝分裂中期染色体（2n=14）进行原位杂交（2n=14），探针的描述见文献[22]，对照探针使用地高辛标记dUTP，并使用抗地高辛偶联的FITC检测，蓝光激发下呈绿色荧光。染色体用DAPI复染（UV激发下呈蓝光）。每张图片包含了数码相机摄取的三张荧光图片，并使用Adobe Photoshop进行了叠加。（a）延展良好并只有少量细胞质和背景杂交的有丝分裂中期染色体可以很清晰地看到FISH信号：在4对不同的染色体着丝粒上检测到4个5S rDNA位点（绿色），两主（三角键）两次（箭头）EPRV位点（红色）。EPRV次信号带在每条染色质上都表现为一种不规则的“双点”状信号，说明有几个拷贝的插入，EPRV主信号带则呈现出类似数十个病毒拷贝的整合现象。染色体（X）附近非特异性ERPV信号或者表现为中空的柱形信号（*）的，可以不予考虑。（b）细胞质的背景荧光干扰了FISH信号。在一个不常见的末端位置，同源染色体上没有对应信号的双点强荧光信号（**）是错误信号。（c）染色体上或者染色体附近强的非特异性背景荧光干扰了正常信号。（d）星点状非特异性强红光和绿光信号表明探针已经降解，从而导致标记的聚集。多数染色体着丝粒的绿色对照探针微弱的FISH信号依然可见。正常EPRV信号却没有被检测到。注意非特异性背景信号表现为边界清晰的圆形，而正常杂交信号由非均匀分布的小点组成。注意区别次EPRV信号（a）与双点荧光(b)、主EPRV信号（a）与非特异性的大点荧光（d）。标尺=10 μm